Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene,
Fleischhygiene und -technologie,
Fachrichtung Lebensmittelhygiene, des
Fachbereiches Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin

Zur Bedeutung der Kontaminationsflora als Ursache unspezifisch positiver Resultate im mikrobiologischen Hemmstofftest

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

H a s s a n A l a g h a m a n d a n
aus Teheran

Berlin 1976
Journal-Nr. 900

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene,
Fleischhygiene und -technologie,
Fachrichtung Lebensmittelhygiene, des
Fachbereiches Veterinärmedizin der
Freien Universität Berlin

Zur Bedeutung der Kontaminationsflora als Ursache unspezifisch positiver Resultate im mikrobiologischen Hemmstofftest

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

H a s s a n A l a g h a m a n d a n
aus Teheran

Berlin 1976

Journal-Nr. 900

Gedruckt mit Genehmigung

des Fachbereiches Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

Vorsitzender des FBR:	Prof. Dr. H.-H. Frey
Referent:	Prof. Dr. H.-J. Sinell
Korreferent:	Prof. Dr. G. Reuter

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der Promotion: 22. November 1976

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Literaturübersicht	2 - 34
2.1.	Rückstände von antimikrobiell wirksamen Stoffen im Fleisch der Schlachttiere	2 - 19
2.1.1.	Therapeutische Antibiotika-Anwendung in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung	2 - 3
2.1.2.	Prophylaktische Verabreichung von Chemotherapeutika in der Massentierhaltung	3 - 5
2.1.3.	Gesundheitsgefährdung des Menschen durch antimikrobiell wirksame Hemmstoffe	6 - 7
2.1.4.	Beeinflussung der Ergebnisse der bakteriologischen Fleischuntersuchung	7 - 8
2.1.5.	Allergische und toxische Nebenwirkungen	8 - 9
2.1.6.	Resistenzbildung	9 - 10
2.1.7.	Störung technologischer Prozesse in der Lebensmittelherstellung	10 - 11
2.1.8.	Mikrobiologische Methoden zum Nachweis von Hemmstoffen	11 - 14
2.1.8.1.	Verfahren mit flüssigen Nährböden	11 - 12
2.1.8.2.	Verfahren mit festen Nährböden	12 - 14
2.1.9.	Mikrobiologisch-chemisches Antibiotika-Nachweisverfahren	14 - 15
2.1.10.	Originäre Hemmstoffe, die die Ergebnisse der Tests beeinflussen können	15 - 19

		Seite
2.2.	Pseudoreaktionen beim mikrobiologischen Hemmstofftest unter besonderer Berücksichtigung der antagonistisch wirkenden Mikroflora	19 - 34
2.2.1.	Zur Mikroflora des Probenmaterials	19 - 23
2.2.1.1.	Die Möglichkeiten der Kontamination von Muskulatur und Nieren beim Rind	20 - 22
2.2.1.2.	Die Möglichkeiten der Kontamination von Muskulatur und Nieren beim Schwein	22 - 23
2.2.2.	Antagonismus der potentiell vorhandenen Keime gegenüber dem Stamm Bac. subtilis	23 - 34
2.2.2.1.	Definition des Begriffes "Antagonismus"	24
2.2.2.2.	Frühe Untersuchungen über den Antagonismus	25
2.2.2.3.	Faktoren und Wirkungsmechanismen des Antagonismus	25 - 31
2.2.2.4.	Methoden zum Nachweis antagonistischer Reaktionen	31 - 34
3.	Eigene Untersuchungen	35 - 70
3.1.	Material	35
3.2.	Methodik	36 - 56
3.2.1.	Der Hemmstofftest	36 - 39
3.2.2.	Mikrobiologisch-chemische Verfahren zum Nachweis von Antibiotika (MC-Test)	42 - 46
3.2.2.1.	Objektträgerverfahren, Kurzzeitniederspannungselektrophorese	42 - 46
3.2.3.	Methodik der Flora-Analyse in verkeimten hemmstoffnegativen Proben	46 - 55
3.2.3.1.	Auswahl der Proben	46 - 47

		Seite
3.2.3.2.	Isolierung von Kontaminanten mit inhibitorischer Aktivität	47 - 51
3.2.3.3.	Identifizierung von Reinkulturen	51 - 55
3.2.3.4.	Prüfung der antagonistischen Wirkung isolierter Stämme gegenüber Bac. subtilis BGA	55
3.2.4.	Prüfung der Dialysierbarkeit von Hemmstoffen aus verkeimtem Organmaterial	56
3.3.	Untersuchungsergebnisse	56 - 70
3.3.1.	Der Nachweis von Hemmstoffen bei gesunden Schlachtrindern	56 - 58
3.3.2.	Ergebnisse der Untersuchungen über die Spezifität der im Hemmstofftest als positiv bewerteten Proben	58 - 62
3.3.3.	Antagonistische Wirkung von Mikroorganismen aus kontaminierten Proben auf den Teststamm Bac. subtilis BGA	62 - 64
3.3.3.1.	Häufigkeit unspezifischer Hemmwirkungen	62 - 64
3.3.4.	Isolierung und Eigenschaften inhibitorisch wirksamer Stämme	64 - 70
3.3.4.1.	Differenzierung	65 - 68
3.3.4.2.	Testung der Hemmaktivität	68 - 70
4.	Diskussion	71 - 78
5.	Zusammenfassung	79
	Summary	80
6.	Literatur	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547206_0017

1. Einleitung

Im Rahmen der amtlichen Untersuchung auf Rückstände sind nach den Vorschriften der Anlage 4 zu § 20 der neugefaßten AB.A - zum Fleischbeschaugesetz Fleisch- und Muskelproben im mikrobiologischen Test auf Hemmstoffe zu untersuchen. Die hohe Sensibilität des als Testkeim für diese Untersuchungen verwendeten Bac. subtilis BGA ermöglicht es, auch geringe Gehalte an Antibiotika bzw. Chemotherapeutika zu erfassen. Diese Sensibilität scheint aber auch einen Unsicherheitsfaktor im Nachweissystem darzustellen, weil es eine Reihe anderer Stoffe gibt, die zu einer Hemmung dieses Stammes führen können. Derartige Pseudoreaktionen, die das Vorhandensein von unerlaubten Rückständen vortäuschen und zu einer möglicherweise ungerechtfertigten Beanstandung der Schlachttierkörper führen können, waren vor kurzer Zeit eines der Argumente in der Diskussion um die Einführung der mikrobiologischen Rückstandsuntersuchung.

Die vorliegenden Untersuchungen gehen von dem Ansatz aus, daß zumindest ein Teil der falsch positiven Resultate des mikrobiologischen Hemmstofftestes (HT) auf der antibiotischen Aktivität von Mikroorganismen beruht, die zur kontaminierenden Fleischflora gehören. Ziel der Arbeiten sollte sein, die Bedingungen zu überprüfen, unter denen solche Reaktionen zustande kommen, einige der dabei beteiligten Organismen zu isolieren und zu identifizieren und Vorschläge zur Vermeidung derartiger Fehlresultate zu erarbeiten.

2. Literaturübersicht

2.1. Rückstände von antimikrobiell wirksamen Stoffen im Fleisch der Schlachttiere

Unter Hemmstoffen sind Substanzen zu verstehen, die das Wachstum von Mikroorganismen unter bestimmten Bedingungen hemmen. Sie haben neben ihrer eigentlichen Hemmstoffwirkung in den letzten Jahren auch deshalb immer mehr Bedeutung erlangt, weil sie zunehmend in Lebensmitteln festzustellen waren und das Rückstandsproblem weltweites Interesse gewonnen hat.

An erster Stelle müssen für die vorhandenen Rückstände Antibiotika und andere Chemotherapeutika verantwortlich gemacht werden. Da die Konzentration anderer, möglicherweise ebenfalls in Lebensmitteln tierischer Herkunft vorhandener Wirkstoffe normalerweise unter der Nachweisgrenze liegt, meint KUNDRAT (1968), daß durch Hemmstofftests praktisch nur Antibiotika und Sulfonamide nachzuweisen wären.

2.1.1. Therapeutische Antibiotika-Anwendung in der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung

Die gesteigerte Anwendung von Antibiotika bei der Behandlung erkrankter Haus- und Nutztiere warf schon frühzeitig die Frage auf, ob sich bei den mit Antibiotika behandelten Schlachttieren Konsequenzen bezüglich der hygienischen Beschaffenheit und Unbedenklichkeit des als Lebensmittel gewonnenen Fleisches ergeben. BONFERT und BERRANG (1969) berichteten, daß von 1960 bis 1968 die hemmstoffpositiven Befunde von 4 % auf 17,5 % stetig anstiegen. NASSAL und

NIEPER (1971) berichteten für den Raum Nordbaden ebenfalls von einer ständigen Zunahme hemmstoffpositiver Einsendungen im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung,[+)] die besonders bei Kälbern 1971 mit 30,8 % ihren Höhepunkt erreichten. GEMMER (1975) beobachtete im Raum Frankfurt zu dieser Zeit in Kalbfleisch aus dem Handel in 70 bis 80 % der Fälle positive Hemmstoffreaktionen. In neuesten Erhebungen glaubt der Autor einen deutlichen Rückgang zu erkennen, den er auf die erzieherische Wirkung durch die Änderung der AB.A zurückführt.

2.1.2. Prophylaktische Verabreichung von Chemotherapeutika in der Massentierhaltung

Wenngleich Antibiotika und Sulfonamide oftmals nur in der Absicht angewendet werden, um mangelhafte hygienische Bedingungen in der Tierhaltung durch eine "gute Arzneiprophylaxe" zu kompensieren, so sind sie doch in der modernen Massentierhaltung nicht mehr wegzudenken. Dem Einsatz dieser Arzneimittelprophylaxe in nutritiver Dosierung ist es zuzuschreiben, daß es gelang, die Verluste durch Infektions- und Intoxikationskrankheiten einzudämmen und die Todesfälle auf ein Minimum zu beschränken. Von entscheidender Bedeutung ist dies für spezialisierte Mastbetriebe, um den Transport- und Umstellungsstress bei neu eingestellten Tieren ohne Verluste schnell zu überwinden.

Nachdem durch Antibiotikafütterung außerdem ein deutlicher Wachstumseffekt nachgewiesen werden konnte (CATRON, 1954), wurden Anti-

---

+) soweit die amtliche bakteriologische Fleischuntersuchung gemäß § 20 AB.A gemeint ist, wird im folgenden gelegentlich die Abkürzung "BU" verwendet.

biotika in großem Umfang in nutritiven Dosen an Geflügel, Schweine und Kälber verfüttert. Dieser wachstumsfördernde Effekt war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (GROTH, 1960; TIEWS, 1970), ohne daß der Wirkungsmechanismus völlig geklärt werden konnte. Daß nicht nur bei mangelhaften hygienischen Haltungsbedingungen derartige Wachstumseffekte zu erzielen waren, hat kürzlich ROGLMEIER (1975) bei hygienisch optimal gehaltenen Kälbern gezeigt, bei denen er die höchsten Gewichtszunahmen nachwies.

Die wirtschaftliche Bedeutung der nutritiven Antibiotikaanwendung liegt dabei in der Tatsache begründet, daß eine bessere Mastleistung bei gleichem oder geringerem Futterverbrauch erreicht werden kann. Nach Auffassung von FAO-Experten (u.a. MOSSEL, 1969; van SCHOTHORST, 1969) ist es nur unter Einsatz der Antibiotika und der Massentierhaltung möglich gewesen, in den letzten Jahren Fleisch in ausreichender Menge und zu einem erschwinglichen Preis zu produzieren. Das hat jedoch dazu geführt, daß die Rückstandsprobleme bei Schlachttieren immer gewichtiger wurden.

Eine überaus große Zahl Publikationen befaßte sich mit dem Nachweis von Rückständen in Fleisch und Organen von Schlachttieren vorwiegend zu der Zeit, als vornehmlich Oxytetracyclin in heute als zu hoch angesehenen nutritiven Dosen (130 ppm) dem Futter beigemischt wurde und als ein grauer Markt eine billige Versorgung mit "Fütterungsantibiotika" gewährleistete.

So gaben GISSKE, WENZEL, PICHNARCIK, SCHAPER und ENNEN (1970)

für normal geschlachtete und tauglich bewertete Kälber Hemmstoffrückstände bis 67,3 % an. Später berichteten BARTELS, ANGERSBACH und KLARE (1972), daß sie bei Kälbern, die sämtlich als tauglich bewertet worden waren, in 82,5 % hemmstoffpositive Fälle ermittelten. Aber nicht nur bei Kälbern, die im Inland zur Schlachtung kamen, wurden solche hohen Prozentsätze festgestellt. Nach MAYER (1973) wurden 1971 bei Kälbern, die in verschiedenen Schlachthöfen Belgiens und Hollands geschlachtet und in das Bundesgebiet eingeführt worden waren, in einzelnen Sendungen bis zu 100 % hemmstoffpositiver Schlachttierkörper gefunden.

Nach Reduzierung des Oxytetracyclinzusatzes auf 80 ppm und Bestimmung von Absetzfristen bei der Verfütterung antibiotikahaltiger Futtermittel ist die Zahl der hemmstoffpositiven Fälle stark zurückgegangen. Dazu beigetragen hat auch die Eindämmung des grauen Arzneimittelmarktes und die erzieherische Wirkung der seit 1974 in Kraft getretenen Rückstandsuntersuchungen. Von ausschlaggebender Bedeutung dürfte es aber gewesen sein, daß schwer resorbierbare Antibiotika - Zinkbacitracin, Flavomycin und Nitrovin (SCHMIDT et al., 1975) - in der Tierernährung eingesetzt wurden, so daß Rückstände heute mit großer Sicherheit nicht mehr in den früher festgestellten Mengen zum Verbraucher gelangen. Obwohl bei den ebenfalls für die Tierernährung zugelassenen Antibiotika Tylosin, Virginiamycin und Oleandomycin die Frage der Rückstandsbildung noch nicht ausreichend untersucht ist (SCHMIDT, 1974), scheinen Befürchtungen nicht angebracht zu sein.

2.1.3. Gesundheitsgefährdung des Menschen durch antimikrobiell wirksame Hemmstoffe

PICHNARCIK, WENZEL und GISSKE (1969) stellten in den Vordergrund aller Überlegungen die Frage: "Wird durch Rückstände der am Tier angewendeten Arzneimittel und anderen Wirkstoffe, speziell Antibiotika, die Gesundheit des Verbrauchers durch die aufgenommenen Lebensmittel gefährdet?" Die Autoren führten folgende Punkte einer möglichen gesundheitlichen Beeinflussung des Menschen durch Antibiotikarückstände in Lebensmitteln an:

a) toxische Erscheinungen durch chemische Veränderungen der Antibiotika im Lebensmittel (Muskulatur, Organe schlachtbarer Haustiere),
b) allergische Erscheinungen durch Antigen- und Hapteneigenschaften der Antibiotika,
c) Veränderung der Darmflora und der Darmwand beim Menschen,
d) Maskierung der für den Menschen pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln, die von mit Antibiotika behandelten Schlachttieren gewonnen worden sind,
e) Resistentwerden pathogener und apathogener Mikroorganismen,
f) Verbreitung chemoresistenter Krankheitserreger,
g) Verringerung der Behandlungsmöglichkeiten beim Menschen durch die Verbreitung chemoresistenter Krankheitserreger namentlich aus der Familie der Enterobacteriaceae sowie bei Erregern von Zoonosen (van KEULEN,1965).

Von diesen vielfältigen Gefahrenmomenten sind für die tierärzt-

liche Lebensmittelüberwachung wegen ihrer großen praktischen Bedeutung folgende Gesichtspunkte von Wichtigkeit:

2.1.4. Beeinflussung der Ergebnisse der bakteriologischen Fleischuntersuchung

Durch CLARENBURG und KAMPELMACHER (1967) wurde nachgewiesen, daß die Ergebnisse der bakteriologischen Fleischuntersuchung durch antibiotische Behandlung der Tiere vor der Schlachtung negativ ausfallen könnte, obwohl spezifische Infektionskrankheiten vorgelegen hatten. Dies fanden sie bei einem Falle von Milzbrand, dessen Nachweis erst nach längerer Anreicherung gelang, sowie bei Kälbern, die mit Salmonellen infiziert waren.

KALICH und MERKENSCHLAGER (1958), MEYN, KALICH und MERKENSCHLAGER (1970), FOLTIN (1960) berichteten über die Unterdrückung des Salmonellenwachstums nach Behandlung mit therapeutischen Dosen. Dies wurde aber nicht beobachtet, wenn die übliche nutritive Antibiotika-Verabreichung erfolgte Das Resistenzspektrum der Salmonellen dürfte seitdem eine entscheidende Wandlung erfahren haben, denn die verbreitete Resistenz der Salmonellen gegen Antibiotika ist bekannt (NETER, 1969).

Von SPROCKHOFF (1960) berichtete über eine Wachstumsverzögerung bei Rotlaufbakterien sogar nach nutritiver Terramycin-Verabreichung und GEMMER (1968) beobachtete bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung Bac. anthracis in so uncharakteristischem Wachstum, daß die

diagnostische Erfassung erhebliche Schwierigkeiten bereitete.

2.1.5. Allergische und toxische Nebenwirkungen

Nach BISPING (1962) können durch wiederholte Therapie mit dem gleichen Antibiotikum sowohl beim Menschen als auch beim Tier Allergieerscheinungen auftreten. Sie könnten aber auch durch beruflich bedingten Kontakt mit Antibiotika ebenso wie durch antibiotikahaltige Lebensmittel in höheren Dosen hervorgerufen werden.

Während FERRANDO (1954) und KNOTHE (1967) die über Lebensmittel verabfolgten Dosen zur Sensibilisierung für zu niedrig halten, behauptet STEFFEN (1968), daß nur ein Bruchteil derjenigen Dosis ausreichend für das Auftreten solcher Reaktionen sei. WELCH (1957), BISPING (1962) und KEWITZ (1970) halten es für möglich, daß die hohen Prozentsätze der Antibiotikazusätze in Futtermitteln aus dem Schlachttier unzureichend eliminiert werden und in Lebensmittel tierischer Herkunft gelangen, die dann die Sensibilisierung verursachen.

Nicht allein Antibiotika und ihre Derivate können Ursache auftretender allergischer Erscheinungen sein, sondern auch die im Präparat vorhandene Proteinverunreinigungen sowie Begleit- und Hilfsstoffe spielen in der Genese der Sensibilisierung eine große Rolle (MAYR und BIBRACK, 1969). Allergische Erscheinungen, die dadurch hervorgerufen werden, können von lokalen Symptomen (ekzematöse Hautveränderungen) bis zu schwersten Allgemeinerkrankungen und sogar zu anaphylaktischem Schock mit Todesfolge reichen.

Neben Penicillin und Streptomycin wurde neuerdings das Chloramphenicol wegen seiner ausgezeichneten antibiotischen Wirksamkeit in der Tierheilkunde immer stärker angewandt, wodurch es öfters zu Sensibilisierungen kam. FORCK (1971) wies in dem Zeitraum von 1965 bis 1970 eine Versechsfachung der Chloramphenicolallergie nach.

2.1.6. Resistenzbildung

Bei ständiger Antibiotikaverarbeitung, ob prophylaktisch oder therapeutisch in Human- und Veterinärmedizin oder in der Tierernährung nutritiv angewandt, steigt die Resistenz der pathogenen und apathogenen Keime so beträchtlich an, daß diese Antibiotika in ihrer Wirksamkeit stark eingeschränkt werden und schließlich überhaupt versagen. Das Antibiotikum kann dabei auf Bakterien als Mutagen oder Selektionsmittel wirken.

Ein Beispiel dafür ist der Hospitalismus. Wenn ein Antibiotikum über längere Zeit angewandt wird, kommt es zur Entstehung resistenter Varianten, die gegen dieses Antibiotikum unempfindlich sind. Um dies zu verhindern, kann die sogenannte Schaukelmedikation (ZÄHNER, 1965) versucht werden. Diese Methode beruht darauf, daß nach Absetzen eines Medikamentes eine rasche Verringerung der resistenten Keime zustande kommt.

BISPING (1962) und GERLACH (1967) unterschieden zwischen primärer bzw. natürlicher und der sekundären bzw. erworbenen Resistenz von

Mikroorganismen. Diese beiden Typen, Streptomycin-Typ oder auch Genotyp und Penicillintyp, auch Phänotyp genannt, unterscheiden sich voneinander dadurch, daß die Resistenz sich bei dem ersten bereits innerhalb weniger Bakteriengenerationen entwickeln kann und noch längere Zeit nach dem Absetzen des Antibiotikums nachweisbar ist. Dagegen entwickelt sich der Penicillintyp langsamer, geht aber nach dem Absetzen schneller verloren. Nach der Ansicht von BISPING (1962) beruht der Phänotyp auf der Adaptionsfähigkeit der Mikroorganismen.

Während BROGGEMANN (1955), KALICH und MERKENSCHLAGER (1958) sowie TIEWS (1969) die nutritive Anwendung von Antibiotika zur Resistenzbildung bei Bakterien ausschließen, halten BULLING, SCHOLZ, MALLA (1968) und LEBEK (1970) diese für durchaus möglich. Der SWANN-Report (1969) sowie HOJOVEC und FISER (1971) bestätigten experimentell die Ansicht, daß durch Verfütterung von Antibiotika in nutritiven Dosen vor allem für Tetracyclin eine Resistenzbildung der Keime entwickelt wird.

2.1.7. Störung technologischer Prozesse in der Lebensmittelherstellung

Rückstände von Antibiotika in Fleisch und Organen sowie in der Milch führen häufig zur Störung technologischer Prozesse bei der Gewinnung und Verarbeitung von Lebensmitteln, zu deren Herstellung Mikroorganismen erforderlich sind (SCHEIBNER, 1969; OBIGER, 1973).

Wenngleich die dadurch bedingte Gesundheitsgefährdung des

Verbrauchers ohne große Bedeutung sein dürfte, können sie jedoch zu schweren wirtschaftlichen Einbußen führen. Dies gilt vor allem für die Milchwirtschaft, wo ebenfalls ein biologischer Hemmstofftest in die Routineuntersuchung eingeführt worden ist.

2.1.8. Mikrobiologische Methoden zum Nachweis von Hemmstoffen

Zum Nachweis von antibiotisch wirkenden Substanzen aus biologischem Material hat sich der mikrobiologische "Allgemeine Hemmstofftest", heute Hemmstoff-Test genannt, durchgesetzt. Dieses Verfahren wurde schon früher zur Sensibilitätsprüfung von Mikroorganismen gegenüber bekannten Hemmsubstanzen eingesetzt (MARTEN, 1964) und vom Arbeitskreis lebensmittelhygienischer tierärztlicher Sachverständiger (ALTS) in mehrjähriger Arbeit für die Anwendung in der amtlichen Fleischuntersuchung modifiziert. Mit Hilfe empfindlicher Testkulturen wird dabei der Hemmstoff im Probenmaterial indirekt nachgewiesen. Entsprechend den Aggregatzuständen der Nährböden kann man ganz allgemein zwei Verfahren unterscheiden.

2.1.8.1. Verfahren mit flüssigen Nährböden

Dieses Verfahren ist besonders gut für die Untersuchung von flüssigem Material geeignet. Dabei benutzt man zum Nachweis des Wachstums der Testkeime verschiedene Indikatoren. Als solche Indikatoren verwenden u.a. KOTTER, TERPLAN und SCHULZ (1959) Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), FRANK (1963) und BRUNN (1971) Methylen-

blau, KUNDRAT (1968) und SCHÖNHERR (1965) Resazurin und STAVIKOVA (1969) Indigokarmin. Auch andere Indikatoren wurden als gut geeignet gefunden, so das Janusgrün (SCHÖNHERR, 1965) sowie von KRAACK und TOLLE (1965) das Brillantschwarz. SCHÖNHERR (1965) hat auch die Nitratreduktion als Kriterium empfohlen.

2.1.8.2. Verfahren mit festen Nährböden

Diese Methode wurde von PICHNARCIK, WENZEL und GISSKE (1969) als eine standardisierte Methode angegeben, weil sie einfach durchführbar ist und vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse gewährleistet.

Die Testkeime werden bei dem Verfahren den festen Nährböden schon bei der Herstellung zugegeben. Die Hemmstoffe der aufgebrachten Gewebeproben diffundieren in den Nähragar hinein und hemmen das Wachstum der Testkultur im Diffusionsbereich. Die Hemmhöfe um die Organproben werden dann bei der nachfolgenden Bebrütung sichtbar. Nach der Art der Aufbringung des zu untersuchenden Probengutes auf die Nährböden lassen sich 4 Verfahren unterscheiden:

Das Gefrierblockverfahren nach GARTSIDE (1960) modifiziert nach FORSCHNER (1962)

Bei diesem Verfahren benutzt man Extrakte aus Muskel- und Organproben. Diese Methode kann ebenso wie die Zylindermethode nach OBERZILL (1962) auch für die Untersuchung von Flüssigkeiten angewandt werden. Die Fließpapierplättchen werden mit den entsprechenden Extrakten durchtränkt oder direkt in die Schnittfläche

der Muskel- und Organproben gelegt und dann auf die mit Teststämmen beimpften Nährböden gebracht. KÄFERSTEIN (1964) wies darauf hin, daß durch das unterschiedliche Aufsaugvermögen der Fließpapierplättchen ein Einfluß auf die Größe der Hemmhöfe erfolgen kann. Diese Fehlerquelle kann weitgehend ausgeschlossen werden, wenn standardisierte Testplättchen verwendet werden.

Das Lochtestverfahren nach CORETTI (1959)

Diese Methode eignet sich sowohl zur Hemmstoffuntersuchung von Feststoffen als auch von Flüssigkeiten. In die beimpften Nährböden werden Löcher gestanzt, in die die zu untersuchende Flüssigkeit einpipettiert wird. Diese diffundiert dann von hier in das Nährboden-Testkultur-Gemisch.

Das Zylinderverfahren nach OBERZILL (1962)

Dieses Verfahren benutzt man überwiegend zum Nachweis von Hemmstoffen in Flüssigkeiten. In den Nährboden werden Zylinder aus Glas oder Metall von 10 mm Länge und 6 mm Durchmesser gedrückt, die mit dem Untersuchungsmaterial mittels Pipette gefüllt werden. Aus dem Zylinder erfolgt die Diffusion in den umgebenden mit den Testkeimen versehenen Nährboden.

Auflage-Methode ohne Vorbereitung des Materials nach LORENZEN (1967), NASSAL und NIEPER (1971)

Bei diesem Verfahren wird das zu untersuchende Material als Stückchen auf die Nährbodenoberfläche gelegt, der den Testkeim enthält. Hierbei ist das Ausmaß der Hemmzonenbildung besonders

abhängig von der Art der Testkeime, von der Beschaffenheit des Nährbodens, besonders dem pH-Wert sowie von der Art der anwesenden Antibiotika.

2.1.9. Mikrobiologisch-chemisches Antibiotika-Nachweisverfahren (M.C.-Test)

Die Möglichkeit, Hemmstoffe elektrophoretisch zu trennen und bioautographisch nachzuweisen, zeigte MARTEN (1964) auf. WENZEL (1971) und ROTH (1971) entwickelten ein kombiniertes physikochemisch-mikrobiologisches Nachweisverfahren, um Antibiotika im Fleisch und in Organen sowohl qualitativ als auch quantitativ in einem einfachen Arbeitsgang spezifisch zu erfassen. Die Autoren gingen davon aus, daß es möglich ist, Hemmstoffe elektrophoretisch zu trennen und sie anschließend mikrobiologisch nachzuweisen.

Das Prinzip basiert auf der Möglichkeit der hochspannungs-elektrophoretischen Trennung der Antibiotika, die im Gleichstrom abhängig von Molekülgröße und Eigenladung unterschiedlich weit zur Anode bzw. Kathode wandern, wobei jede Laufstrecke für ein bestimmtes Antibiotikum substanzspezifisch ist (ROTH, 1971).

Im zweiten Arbeitsgang wird das Laufmedium mit einem Bakterien-Agargemisch von 10^4 Sporen/ml Agar überschichtet und anschließend bebrütet. Nachdem die Laufstrecken und Hemmhofflächen ausgemessen sind, werden sie mit Hilfe von Eichkurven qualitativ und

quantitativ verglichen. Das Verfahren ist 1973 von LANGNER et al. modifiziert worden.

2.1.10. Originäre Hemmstoffe, die die Ergebnisse der Tests beeinflussen können

Schon seit dem Ende des 19. Jahrhunderts sind Substanzen mit antimikrobieller Aktivität bekannt. So wiesen schon NUTTAL (1888) sowie BUCHNER (1889) - beide zitiert nach SKARNES u. WATSON (1957) - die bakterizide Wirkung des zellfreien Serums warmblütiger Tiere nach. Da die Hemmung nach dem Erhitzen der Seren nicht mehr nachweisbar war, schrieb man diese Wirkung Eiweißkörpern zu. 1894 stellten BUCHNER et al. fest, daß Leukozytenextrakte gegenüber gramnegativen Keimen antibakteriell aktiv waren. HIRSCH (1951) nannte solche bakterizide Substanzen, die er selbst aus neutrophilen Granulozyten von Menschen, Kaninchen und Schweinen isolierte, "Phagozytin".

FLEMING (1922) erwähnte Lysozym als keimhemmend gegenüber gramnegativen pathogenen Bakterien und saprophytären Keimen. Die antibakterielle Aktivität des Lysozyms wurde weiterhin von ILLES und IVANYI (1969) im Hühnerei nachgewiesen. WATSON und BLOOM (1952) wiesen auf eine antimikrobielle Fähigkeit des Lysins hin, wie auch KATCHALSKI et al. (1952) Lysin, Ariginin und Ornithin als wachstumshemmend beschrieben.

Van HEYNINGEN (1951) beobachtete die antimikrobielle Wirkung des

Hämatins wie auch KAMMERER (1914) und KOTTER (1960) die einiger Blutabbauprodukte (Eisenporphyrinfarbstoffe). Nach KOTTER et al. (1959) kommen Inhibine in der Galle vor. Ebenfalls wiesen MILLER (1942), NEGRONI und FISCHER (1944), BLOOM und BLAKE (1948), BLOOM und PRIGMORE (1952) und BURGER und STAHLMANN (1952) auf die bakterizide Wirkung der basischen Polypeptide im Bereich der Amine und Aminosäuren hin. Blutinhaltsstoffe mit antibakterieller Wirkung wurden von SKARNES (1957) in zwei Gruppen unterteilt:

Auf gramnegative Keime wirken:	Komplement
	Properdin
	Phagozytin
	Lysozym
Überwiegend auf grampositive Keime wirken:	β-Lysin
	Lysozym
	Histone
	Protamine
	Polypeptide
	Leukin
	Plakin
	Hämatin
	Spermine
	Lactin

Weiterhin wurde die Milchsäure, die im Fleisch bei Reifungsvorgängen entsteht, als weiterer antibakteriell wirkender Faktor

beschrieben (PEDERSEN, 1965; VAN SCHOTHORST, 1969). Nach den Untersuchungen von MANTEL (1971) spielt die natürlich gebildete Milchsäure im Hemmstoff-Test jedoch keine Rolle. Auch ROTH (1971) konnte durch Milchsäure eine Wachstumshemmung auf den Testkeim Bac. subtilis Bremen erst bei einer Konzentration von 7 mg Milchsäure / 50 ul Phosphatpuffer nachweisen. Da normalerweise die durchschnittliche Milchsäurekonzentration in den Fleischproben bei 0,5 - 0,7 mg liegt, ist nach ROTH eine Beeinflussung des Hemmstoff-Testes von dieser natürlich gebildeten Säure nicht zu erwarten.

SCHAAL (1961) schreibt Fäulnisprodukten des Fleisches, die er nicht näher definiert, eine hemmende Wirkung gegenüber Mikroorganismen zu. Diese Beobachtung konnte durch die Untersuchung von MEYER et al. (1969) nicht bestätigt werden. Letztere vertraten dazu die Meinung, daß bestimmte Bakterien oder deren Stoffwechselprodukte diese unspezifische Eigenhemmung bewirken. Auch GAL und VAJDA (1968) wiesen auf einen solchen antibakteriellen Stoff hin, der vermutlich von Mikroorganismen im Fleisch gebildet wird und als identisch mit "Nisin" angesehen wird.

In der Milch wurden ähnlich wirkende Substanzen, die Bac. stearothermophilus zu hemmen vermögen, von ASHTON u. BUSTA (1968) dargestellt.

Es sind dies:

Lactotransferrin	Poly-L-Lysin
Protaminsulfat	β-Lactoglobulin
Casein	Serumalbumin des Rindes

Als weitere wichtige natürlich vorkommende Hemmstoffe müssen auch die Pflanzeninhaltsstoffe (Phytozide) mit keimhemmender Wirkung genannt werden. Sie entfalten in der Regel erst dann ihre Aktivität, wenn sie von den Tieren aufgenommen werden.

Nach WINTER (1952) enthalten fast 30 % aller höheren Pflanzen diese Wirkstoffe, u.a. sind dabei wichtig: Gartenkresse, Kapuzinerkresse und die Petersilie. Nach HIRSCH (1951) beinhalten die Weintrauben, Himbeeren und Vogelbeeren als hemmenden Faktor Salicylsäure. Ferner enthalten die Vogelbeeren Sorbinsäure. SUBBA (1967) berichtet über die antibakterielle Aktivität des Citrusöls. HALBEISEN (1954) stellte fest, daß die Kombination der Extrakte von Kapuzinerkresse und Meerrettich zu einer antagonistischen Wirkung führt. VOGEL (1953) beschrieb hemmende Eigenschaften des Preßsaftes von Meerrettich, Zwiebel, Porree, Bärenlauch, Stachelbeeren, Hahnenfußgewächsen sowie von Gartenkresse, Kapuzinerkresse und Eicheln. GAL und VAJDA (1968) isolierten Phytozide aus Hanfabfällen und GAL (1968) beschrieb hemmende Eigenschaften von Capsicidin und Capsaicin, den Inhaltsstoffen des Gewürzpaprikas.

KLIMA (1966) wies auf Grund eigener Untersuchungen auf die Möglichkeit einer Beeinflussung des Hemmstoffnachweises im Rahmen der BU durch die in Pflanzen vorkommenden antibakteriell wirkenden Substanzen hin. WELZ (1967) dagegen fand, daß die von ihm untersuchten Pflanzeninhaltsstoffe als keimhemmende Faktoren in der bakteriologischen Fleischuntersuchung keinerlei Bedeutung

hätten. Untersuchungen von ZEITRÄG (1970) bestätigen diese Feststellung. Er konnte in Milchproben von Kühen, die fast nur mit glykosidhaltigen Pflanzen gefüttert wurden, Hemmstoffe mittels mikrobiologischer Tests nicht nachweisen.

2.2. Pseudoreaktionen beim allgemeinen Hemmstofftest unter besonderer Berücksichtigung der antagonistisch wirkenden Mikroflora

Neben einer unterschiedlichen Nährbodenempfindlichkeit verschiedener Mikroorganismen ist bei Bac. subtilis (BGA-Stamm) auch mit entsprechenden Einflüssen von Schweinenieren und Kälberblut zu rechnen. Aber auch die qualitative und quantitative Keimbelastung des Untersuchungsmaterials sollte nach KUNDRAT (1973) als wesentliche Beeinflussungsmöglichkeit berücksichtigt werden. Diese saprophytäre Mikroflora, mit deren Vorhandensein im Untersuchungsgut ständig gerechnet werden muß, kann zumindest in weiter fortgeschrittenen Verderbsstadien ohne Zweifel auch die Ergebnisse des mikrobiologischen Hemmstofftestes beeinflussen. Hierüber sind in der Literatur vielfältige Vermutungen geäußert worden (SCHAAL, 1961; INAL, 1972; FORSCHNER, 1962 und 1973; FORSCHNER und GLENDE, 1976; HEINERT et al., 1976), ohne daß allerdings systematische Untersuchungen darüber existierten.

2.2.1. Zur Mikroflora des Probenmaterials

Nach § 27 AB.A können die für die bakteriologische Fleischuntersuchung bestimmten Proben auch zur Untersuchung auf Hemmstoffe verwendet werden. Eine im Probenmaterial nachweisbare Mikroflora kann dabei sowohl intra vitam durch septikämische Prozesse oder auf Grund transportbedingter Streßsituation (PUSZTAI u. IVANOVITS, 1970, zi-

tiert nach LEVETZOW, R., Arch. Lebensmittelhygiene 23, 240-242, 1972) entstanden sein. Sekundär kann es zu postmortalen Verunreinigungen durch die Mikroflora der äußeren Haut und des Magen-Darm-Traktes kommen. Auf derartige Kontaminationen, z.B. beim Entnahmeprozeß, aber auch auf zusätzliche Anreicherungseffekte durch Verpacken ungenügend gekühlten Materials oder längere Transportzeiten bei ungünstigen Außentemperaturen wies PÄHR (1963) hin. Auch SEIDEL und KIND (1965) führten das Ansteigen des unspezifischen Keimgehaltes in den Sommermonaten insbesondere auf ungünstige Versandbedingungen zurück. KLEIN und DITGENS (1966) bestätigten experimentell Verunreinigungen und Anreicherungen als Ursache für eine Veränderung des unspezifischen Keimgehaltes. Sie wiesen auch auf die Abhängigkeit von der Person des Entnehmenden und damit von der Entnahmetechnik hin. Eine Literaturstudie sowie Ergebnisse einer Umfrage bei Veterinäruntersuchungsämtern über die Problematik des unspezifischen Keimgehaltes im Rahmen der amtlichen bakteriologischen Fleischuntersuchung haben MARX und REUTER (1974) erarbeitet.

2.2.1.1. Die Möglichkeiten der Kontamination von Muskulatur und Nieren beim Rind

Außer den beim Schlachtprozeß stattfindenden sekundären Verunreinigungen werden Muskulatur und Nieren bei der Probeentnahme durch Kontakte mit dem Arbeitspersonal oder mit Geräten infiziert. Die Kontaminanten stammen dabei vorwiegend aus dem Intestinaltrakt

oder von der äußeren Haut. Eine Kontamination durch andere Proben kann auch bei unsachgemäßer Verpackung während des Transportes erfolgen.

In Faeces des erwachsenen Rindes sind sehr verschiedenartige Mikroorganismen enthalten. Während SMITH und CRABB (1961) Streptokokken, Laktobazillen, E. coli und Cl. welchii als die häufigsten Keime ermittelten, setzt sich die zu erwartende Mikroflora nach BUTTIAUX und MOSSEL (1961) aus folgenden Arten zusammen: Bifidobacterium ssp., Ristella ssp., Laktobazillen, Enterobacteriaceen, Gruppe-D-Streptokokken und Clostridien.

Obwohl Laktobazillen und Streptokokken im Intestinum, aber auch in den Schlachträumen und auf frischem Fleisch häufiger auftreten als die psychrotoleranten gramnegativen Species, sind letztere auf Grund ihrer proteolytischen Eigenschaften hygienisch bedenklicher (KELCH, 1953). ELMOSSALAMI (1957) konnte auf der Oberfläche von Rinder-Tierkörpern Pseudomonas-Keime nicht nur unmittelbar nach der Schlachtung, sondern auch im Kühlraum nachweisen. In der Vorkühlhalle fand LUDWIG (1964) diese Keime nach 8 Stunden auf 25 % und nach 24 Stunden auf 50 % der Tierkörper. JEPSEN (1957) ermittelte bei Fleisch frisch geschlachteter Tiere folgende Mikroflora: Achromobacter, Mikrokokken, Flavobakterien, Pseudomonaden, Aerobacter, Proteus, Sc. faecalis, Thermobakterien, Bazillen und Clostridien. In der Reihenfolge der Häufigkeit fand AYRES (1963) auf frischem Rindfleisch Pseudomonas

und Achromobacter bis zu 45 %, unpigmentierte Mikrokokken, Streptokokken, Laktobazillen, aerobe Sporenbildner, Anaerobier und andere Bakterien bis zu 40 % sowie Schimmelpilze und Hefen zu 1 - 10 %. Weiterhin berichtete er über die Abhängigkeit der Mikroflora des Fleisches von der Lagerungsdauer. Er fand bei im Kühlraum bei 0 bis + 10^{0} C aufbewahrtem Rindfleisch vorwiegend Pseudomonaden, während bei Temperaturen von + 15 ^{0} C und darüber Pseudomonaden und Mikrokokken zu etwa gleichen Teilen vorlagen. Außerdem konnte er bei Temperaturen unter + 10^{0} C vereinzelt Achromobacter, Flavobakterien, Bazillen, Clostridien und Streptokokken isolieren.

2.2.1.2. Die Möglichkeiten der Kontamination von Muskulatur und Nieren beim Schwein

Ein Hauptgrund für die oberflächliche Verunreinigung geschlachteter Schweine ist der Keimgehalt des Brühwassers, der seinerseits von der Mikroflora der äußeren Haut und des Intestinaltraktes, vor allem der Aftergegend abhängig ist, daneben aber auch von der Brühwassertemperatur und der Anzahl gebrühter Schweine beeinflußt wird (SCHÖNBERG, 1953; AYRES, 1963; KRAUS, 1960; LERCHE, 1961; LOCHMANN, 1961; VESTING, 1961; KANTE, 1963).

In Faeces des Schweines kommen nach SMITH und CRABB (1961) folgende Keimarten mit abnehmender Häufigkeit vor: Laktobazillen, Bacteroides, E. coli, Streptokokken und Cl. welchii. Demgegenüber behaupteten BRIGGS et al. (1954) und PESTI (1962),

daß Streptokokken und Laktobazillen im Schweinekot hundert- bis tausendmal häufiger auftreten als die Coli-Aerogenes-Gruppe.

Nach FEWINS et al. (1957) ist die Ursache der Reinfektion des Fleisches in aus Schweinefaeces isolierten Laktobazillen wie Lb. acidophilus und Lb. fermenti zu sehen, während VESTING (1961) folgende nach dem Brühen und Reinigen auf der Hautoberfläche gefundene Laktobazillen dafür verantwortlich machte: Lb. brevis, Lb. buchneri, Lb. fermenti, Lb. pastorianus, Lb. plantarum, Lb. casei, Lb. acidophilus, Lb. bifidus und Lb. leichmanii. Dagegen konnten INGRAM (1955) und SHARPE (1962) nachweisen, daß die im Schweinekot enthaltenen Laktobazillen-Arten sich von den nach der Schlachtung aus dem Fleisch isolierten Arten unterschieden. Neben anderen Autoren konnte KANTE (1963) einen starken Befall mit aeroben Sporenbildnern, Kokken und gramnegative Stäbchen, darunter Fluoreszenten, auf der Haut der gebrühten und entborsteten Schweine feststellen. Da er diese Keime erst nach dem maschinellen Entborsten auf der Haut fand, könnte nach seiner Vermutung diese Flora in den Poren der Haut das Brühen überlebt haben und beim Entborsten an die Oberfläche gelangt sein. Auf diesem Weg könnten Arbeitsgeräte, Personal und Schlachträume zu Keimüberträgern werden.

2.2.2. Antagonismus der potentiell vorhandenen Keime gegenüber dem Stamm Bac. subtilis

Erst in jüngerer Zeit wurden Untersuchungen über den Antagonismus, d.h. die Beeinflussung verschiedener Mikroorganismen unter-

einander, auch unter lebensmittelhygienischen Aspekten durchgeführt. Dabei ist es sicherlich kein Zufall, daß sich die meisten Arbeiten auf das antagonistische Verhalten verschiedener Keimarten gegenüber den als Testorganismen häufig verwendeten Bacillaceae bezogen.

2.2.2.1. Definition des Begriffes "Antagonismus"

Im Wechselspiel wachstumshemmender bzw. wachstumsstimulierender Wirkungen kann man, wie MARX (1972) formulierte, aktiv hemmende oder stimulierende Stämme als Effektoren und gehemmte oder stimulierte Species entsprechend als Reagentenstämme bezeichnen. Demzufolge wurde bei den hier beschriebenen Untersuchungen Bac. subtilis BGA als einziger Reagentenstamm angesehen, während als Effektoren die aus Fleisch- und Nierenproben isolierten und hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zu überprüfenden Keimarten galten.

Nach WHEATER et al. (1951) und MOSSEL und INGRAM (1955) lassen sich bei den antibiotischen Substanzen mikrobieller Herkunft verschiedene Gruppen unterscheiden: Im Gegensatz zu den verhältnismäßig unspezifisch antagonistisch wirkenden Stoffwechselprodukten in Form einfacher Moleküle, z.B. H_2O_2, alkoholähnliche Stoffe, organische Säuren, sind die antibiotischen Substanzen komplexer biosynthetisch gebaute Stoffe, die zumeist proteinähnlich und in der Regel artspezifisch sind. Ein Beispiel hierfür ist das "Nisin".

2.2.2.2. Frühe Untersuchungen über den Antagonismus

Die Kenntnis von antagonistischen bzw. synergistischen Prozessen entstammt mehr oder weniger zufälligen Beobachtungen. So stellen ZUKERMANN und MINKEWITSCH (1925) eine Hemmung der überimpften "Pseudodiphterie-Keime" auf einem mit Bac. mesentericus verunreinigten Nährboden fest. SCHIØTZ (1909) beschrieb eine unbeabsichtigte Therapie eines an Diphterie erkrankten Menschen mit Hilfe der Hemmwirkung von Staphylokokken. Über die antagonistische Wirkung der Bazillen, vor allem von Bac. anthracis gegenüber verschiedenen anderen Species wurde bereits früher von BABES (1885), EMMERICH und di MATTEI (1887), GARRE (1887), LEWEK (1890), EMMERICH u. LOEW (1899) und OLITSKY (1891) berichtet.

Andere Autoren berichteten über Abhängigkeiten des mikrobiellen Antagonismus von der Größe der Ausgangsinocula (CONN und BRIGHT, 1919) bzw. von der Art des Mediums (GUNDEL und NIMSTEDT, 1925; DUJARDIN-BEAUMETZ, 1932). Die Wechselwirkungen einiger Keime, z.B. zwischen Streptokokken, Pneumokokken, "Diphterie-" und "Influenza-Bazillen", überprüfte BÜRGERS (1930) anhand systematischer Untersuchungen im Mäuseversuch.

2.2.2.3. Faktoren und Wirkungsmechanismen des Antagonismus

Über die Wirkungsmechanismen in einer Keimpopulation berichtete FORST (1904). Er schrieb die Hemmwirkung von Ps. putida und Ps. fluorescens gegenüber "B. typhosus" deren Stoffwechselprodukten zu, während AVERY und DUBOS (1931) eine solche Wachstumsbeeinträchti-

gung auf die Bildung höchst spezifischer Enzyme zurückführten.

Das Biotop Fleisch ist nicht nur in seiner Zusammensetzung variabel, sondern erfährt auch durch Reifungsprozesse unterschiedliche biochemische Veränderungen. Daneben bedingen Kühlung und Lagerung sowie Entnahme- und Transportumstände eine zusätzliche Veränderung, die die Entwicklung vorhandener Keimpopulationen beschleunigen oder hemmen kann, die aber auch zu Umschichtungen in den Anteilen der Keimflora führen kann. Bei diesen Beeinflussungen lassen sich innere und äußere Wirkungsfaktoren unterscheiden. Zu den erstgenannten zählen zweifellos die erregerspezifischen Eigenschaften, die sogar stammweise verschieden sein können. Solche Merkmale können teilweise oder vollständig für unterschiedliche Zeiträume durch Mutantenbildung variiert werden. Äußere Faktoren sind eine Reihe solcher Einflüsse, die von der Umgebung an die Mikropopulation herangetragen werden, wie etwa Temperatur, Nährbodenangebot, pH-Wert, Wasseraktivität und andere Faktoren, die den physiologischen Zustand der Mikroorganismen beeinflussen. Zwischen inneren und äußeren Faktoren nehmen die Einwirkungen durch Stoffwechselprodukte eine Mittelstellung ein.

Die Bebrütungstemperatur übt den entscheidenden Einfluß auf Populationsveränderungen aus.

Daneben treten in Mischpopulationen auch die Sauerstoffzufuhr und der pH-Wert. Hierüber berichteten OBERHOFER und FRAZIER (1961)

und TROLLER und FRAZIER (1963). Die Temperaturabhängigkeiten bei Wachstumshemmungen verschiedener Keimarten bestätigten PETERSON et al. (1962), GRAVES und FRAZIER (1963), McCOY und FABER (1966) und KAO und FRAZIER (1966). Während LEWIS (1929) die Abhängigkeit von der Sauerstoffzufuhr bei der Bildung antibiotischer Stoffe für notwendig hielt, verneinten dies TROLLER und FRAZIER (1963). Als optimalen pH-Wert-Wachstumsbereich fanden TROLLER und FRAZIER (1963), BARROW (1963) und HSU und WISEMAN (1967) z.B. für Staphylokokken einen Bereich zwischen 6.2 und 7.8, wogegen PETERSON et al. (1962) hierfür Werte zwischen 5.0 und 9.0 angaben. Entsprechende pH-Werte ermittelten PIVOVAROV und KUKHTO (1970) für Bac. cereus sowie ALFORT und PALUMBO (1971) für Salmonellen.

Als weiterer wichtiger Faktor des Wachstums einer Keimpopulation sind das Nährstoffangebot und die Nährstoffverwertung von Bedeutung. Für das optimale Wachstum einer Reinkultur ist jeweils ein ganz bestimmtes Nährmedium notwendig, dessen Qualität vom ausreichenden Vorhandensein spezifischer Wachstumskomponenten abhängt. Allzu hohe Nährstoffkonzentration können dabei aber auch die Wachstumsgeschwindigkeit verringern oder zum Stillstand bringen. Die angebotenen Nährstoffe werden durch einzelne Erregergruppen unterschiedlich verwertet. Die dabei erreichte maximale Konzentration an Mikroorganismen wurde von BAIL (1929) und WIKULLIL (1932) als "M-Konzentration" bezeichnet. BAIL (1929) beschrieb dies als die für jedes Bakterium spezifische Anzahl lebender Keime in einem durch ein bestimmtes Nährstoffangebot charakterisierten Milieu. Wenn dieser Raum ausgefüllt ist, kommt

die Vermehrung scheinbar zum Stillstand. WILSON und MILES (1946) schrieben die Beendigung des Wachstums der Erschöpfung des Sauerstoffvorrates zu.

In einer Mischpopulation ist stets ein Wettbewerb zwischen den einzelnen Keimgruppen vorhanden. Falls die notwendigen essentiellen Wuchsstoffe vorhanden sind, werden diese zuerst von schneller wachsenden Keimarten verwendet. Die langsamer wachsenden Keimarten finden in der Folge nicht mehr ausreichend Nährstoffe, so daß sie in ihrem Wachstum gehemmt bzw. völlig unterdrückt werden. Diesen Vorgang beobachteten OBERHOFER und FRAZIER (1961) und TROLLER und FRAZIER (1963) bei Staph. aureus, der durch E. coli und einen Pseudomonas-Stamm gehemmt wurde. Letztere beobachteten, daß die Hemmwirkung gegenüber den Staphylokokken darauf beruhte, daß die für diese Keimart essentiellen Aminosäuren Cystin, Valin, Glycin, Prolin, Arginin und Asparaginsäure größtenteils durch die Effektoren E. coli und Pseudomonas verwertet wurden. Auch ungünstige Milieuveränderungen durch Anhäufung von Stoffwechselprodukten einer Keimart kann für andere Species Wachstumsunterdrückungen verursachen. HIRSCH (1951) konnte z.B. durch Neutralisierung der entstandenen Milchsäure bei reichlichem Angebot an Kohlenhydraten die zunächst vorhandene Hemmung der Reagenten aufheben.

HOYLE und NICHOLS (1948), BARIBO und FOSTER (1951) und BARROW (1963) berichteten über die Abhängigkeit antibiotischer Wirkungen von der Dauer der gegenseitigen Beeinflussung. Eine starke

Hemmwirkung durch Milchsäurestreptokokken und Laktobazillen stellten diese Autoren nach 24 Stunden fest; nach ca. 60 Stunden erreichte die Hemmwirkung das Maximum, und nach 110 Stunden war sie verschwunden. Nach TROLLER und FRAZIER (1963) wurde auch Staph. aureus nach 6 - 10 Stunden durch verschiedene Enterobacteriaceae-Species gehemmt; diese Hemmung ging aber nach 24 - 36 Stunden wieder zurück. Bei Untersuchungen mit Aerobacter-Stämmen gegenüber Bazillen, S. paratyph. und Staph. aureus fanden BOWLING und WYNNE (1951) dagegen eine Hemmwirkung, die über 72 Stunden unverändert blieb.

Bei ähnlichen Untersuchungen mit Milchsäurebakterien konnte REUTER (1972) eine stärkere Beeinträchtigung durch Streptokokken in der ersten logarithmischen Wachstumsphase und eine ausgeprägte Wachstumsunterdrückung durch homofermentative Laktobazillen in der zweiten, stationären Phase gegenüber Staphylokokken, Bazillen, Enterobacteriaceae und Aeromonas-Pseudomonas-Stämme feststellen.

WODZINSKI und FRAZIER (1961), LIMSONG und FRAZIER (1966), BAIRD-PARKER und FRAMER (1967), STRONG et al. (1970) und HESS (1970) berichteten über die Beeinflussung des Keimwachstums durch die Wasseraktivität des Mediums, machten jedoch keine Angaben hinsichtlich des Wachstums in den Mischpopulationen.

Die Wasseraktivität (aw), ausgedrückt von SCOTT (1957) als osmotischer Druck des Lebensmittels, ist ein Maßstab für das Ver-

hältnis der Wasserdampfspannung über dem Lebensmittel zum Partialdruck des reinen Wassers bei gleicher Temperatur (MOSSEL, 1969). Diese Meßgröße gibt den zur Verfügung stehenden Anteil des ungebundenen Wassers an, das für die Entwicklung aller Mikroorganismen unentbehrlich ist. Eine Zusammenfassung wichtiger Informationen über die Bedeutung der aw-Werte findet man bei RÖDEL und LEISTNER (1971). Wegen weiterer wachstumsbeeinflussender Faktoren, wie etwa die Kochsalz-Konzentration oder den hydrostatischen oder Gaspartialdruck, die ökologisch von Bedeutung sind, sei auf die spezielle Literatur verwiesen (INGRAM, 1955; KAFEL und MAJEWSKA, 1961; CAVETT, 1962; EDDY und INGRAM, 1962; TONGE et al., 1964; OBERZILL, 1966; KAFEL und AYRES, 1969; INGRAM und DAINTY, 1971).

Beim nächsten Faktor handelt es sich um diejenigen Beeinflussungen, die sowohl durch Erregerprodukte als auch durch Stoffwechselwirkungen der Testorganismen zustande kommen. Unter diesen Produkten sind nach WHEATER et al. (1951) und MOSSEL und INGRAM (1955) die einfachen und relativ unspezifischen Stoffe von komplex gebauten Substanzen zu unterscheiden. Zu den erstgenannten stimulierenden bzw. hemmend wirkenden Substanzen sind neben einigen organischen Säuren wie Milchsäure, Fett- und Aminosäuren organische Basen wie Purin- und Pyrimidinbasen und andere einfache Stoffe wie Wasserstoffperoxyd zu erwähnen. Hierzu gehören auch die in früheren Arbeiten erwähnten toxischen Abbauprodukte aus abgestorbenen Bakterienzellen, bei denen es sich um antagonistisch wirksame Enzyme

und Fermente handeln dürfte (FORST, 1904; DOZIER, 1924; AVERY und DUBOS, 1931; ETINGER u. TULCZYNSKA, 1932; GRUNDEL und KLIEWE, 1932).

Die komplex gebauten eigentlichen antibiotischen Substanzen sind Stoffe, die von den Bakterien produziert werden und gegenüber einem mehr oder minder breiten Spektrum von Mikroorganismen antagonistisch wirken. An dieser Stelle sei auf Literaturangaben über die hier gleichfalls einzuordnenden "BACTEROCINE" hinzuweisen (GRATIA, 1925; DULISCOUET, 1935; GRATIA und FREDERICQ, 1946; JACOB et al., 1953; LACHOWICZ und LACHOWICZ et al. (verschiedene Arbeiten 1962 - 1968); HSU und WISEMAN, 1967; BARROW, 1963; GAGLIANO und HINSDILL, 1970; BRANDIS und SMARDA, 1972).

2.2.2.4. Methoden zum Nachweis antagonistischer Reaktionen

Um mikrobielle Einflüsse auf den Hemmstofftest ermitteln zu können, sind methodologisch zwei unterschiedliche Wege zu begehen:

1. Zum Nachweis von wirksamen Stoffwechselprodukten müssen nach einer gewissen Inkubationszeit die Mikroorganismen aus dem Substrat wieder entfernt werden. Dies wurde sowohl mit Chloroformdampf (FREDERICQ, 1948; WYNNE und NORMAN, 1953; ABBOTT und SHANNON, 1958; HSU und WISEMAN, 1967), durch Hitzesterilisierung (BOWLING und WYNNE, 1951) oder Filterpapier (GRATIA, 1946; PARKER und SIMMONS, 1959) sowie im Dialyseverfahren (BOWLING und WYNNE, 1951; RITTER, 1950, 1952, 1956; TROLLER und FRAZIER, 1963)

zum Teil unter Einschaltung der "Continuous flow method" (ZUBRZYCKI und SPAULDING, 1957; HENTGES und FRETER, 1962; FRETER, 1962) durchgeführt. Auf den solcherart behandelten Nährböden kann danach mittels Reagentenstämmen positive oder negative Reaktion, d.h. eine Stoffwechselwirkung nachgewiesen werden.

2. Die Einwirkung von Mikroorganismen aufeinander kann durch verschiedene Beimpfungsverfahren (ROSEBURY et al., 1954 und ZÄHNER, 1965) oder durch Suspensionsversuch (zit. nach MARX, 1972) überprüft werden.

Zum Nachweis antibiotischer Substanzen wurden verschiedene Untersuchungsmethoden entwickelt. Als Prüfmedium benutzte man entweder feste oder flüssige Nährböden. Die festen Nährböden können in drei Formen beimpft werden. Entweder werden Keimsuspensionen auf die Prüfmedien ausgestrichen oder ausgetropft (ROSEBURY et al., 1954; PARKER und SIMMONS, 1959; OBERHOFER und FRAZIER, 1961; GRAWES und FRAZIER, 1963) oder die Nährbodenlösungen werden steril verflüssigt und mit der Keimsuspension vermischt und ausgegossen (LEWIS, 1929; WYNNE, 1947; BLACKFORD et al., 1951; OBERHOFER und FRAZIER, 1961; HENTGES und FRETER, 1962). Die oben genannten Platten wurden auch als "staled agar plates" bezeichnet.

Der Agar-Querstrich-Test, genannt auch als "Cross streak" oder "Multiple streak", wurde von ZÄHNER (1965) zum Zweck der Schnelluntersuchungen einer größeren Anzahl von Stämmen empfohlen. Dabei wird der Effektorstamm diametral ausgestrichen, und die zu untersuchenden Reagenten dazu quer aufgetragen. Dieser Test wurde auch

von JENNINGS und SHARP (1947), GARDNER (1948) und PARKER und SIMMONS (1959) beschrieben.

Zu dem gleichen Zweck wurde auch der Plattendiffusionstest, genannt auch als "drop-plating" (MILES und MISRA, 1938; SNYDER, 1947; POMALES-LEBRON und FERNANDEZ, 1952; BADGER und PANKHURST, 1960; GAUDY et al., 1963) durchgeführt.

ROSEBURY et al., 1954 und VANDERZANT, 1968, schrieben über "Overlapping drop method". Dabei wird ein Tropfen von Effektor-Suspension mit einer Oese auf eine Platte gebracht. Nach dem Antrocknen des Tropfens wird von den zu prüfenden Bouillon-Kulturen ein Tropfen mit der Pipette so darauf aufgesetzt, daß dieser den ersten ungefähr zu einem Drittel überlappt. Nach PARKER und SIMMONS, 1959, werden die sehr wirksamen bzw. die sehr rasch entwickelten Hemmsubstanzen mit einer speziellen Untersuchungsmethode, genannt als "Simultaneous antagonism" direkt geprüft. Diese Methode beruht darauf, daß sowohl Effektor- als auch Reagenten-Stämme innerhalb kurzer Zeit aufgetragen werden, wobei der zuerst aufgetragene Keim innerhalb 30 Minuten angetrocknet wird. Bei dieser Methode wird die Beeinflussung der Hemmstoffbildung durch eine eventuell schneller wachsende Begleitflora verhindert. Demgegenüber wurden die sehr schwach ausgeprägten Hemmwirkungen in zeitlicher Trennung durch zweiphasige Beimpfung, auch als "deferred antagonism" bezeichnet, geprüft. Bei dieser Methode wird der primär aufgetragene Effektor zunächst bebrütet, und erst nach 24 -

48 Stunden erfolgt eine Aussaat der Reagenten-Stämme (GRATIA, 1946; JENNINGS und SHARP, 1947; GARDNER, 1948; LOEB et al., 1950; HSU und WISEMAN, 1967). Bei filtierbaren und dialysierbaren Substanzen sei schließlich noch auf die Verwendung von Kulturfiltraten (BOWLING und WYNNE, 1951; RITTER, 1950; 1952; 1956) bzw. durch Dialysiermembranen getrennten Simultankulturen (BOWLING und WYNNE, 1951; TROLLER und FRAZIER, 1963 a, b) im flüssigen Medium hingewiesen. Hierbei ist ebenso die sogenannte "Continuous flow method" zu erwähnen, bei der ständig frisches Medium zugeführt wird, um die gebildeten Stoffwechselprodukte auszuwaschen (ZUBRZYCKI und SPAULDING, 1957; 1958; HENTGES und FRETER, 1962; FRETER, 1962).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material

In der Zeit von Januar bis September 1973 wurden Fleisch- und Nierenproben von insgesamt 1.200 Tieren, die am Schlachthof Berlin-Spandau zur Schlachtung gekommen waren, auf Hemmstoffe untersucht. Die Tiere waren klinisch gesund und gaben auch auf Grund der Untersuchungen nach dem Fleischbeschaugesetz keinen Grund zur Beanstandung.

Von den untersuchten 950 Schweinen stammten 430 aus der Bundesrepublik, 210 kamen aus der DDR und 310 aus den Niederlanden. Ihr Lebendgewicht betrug durchschnittlich 100 kg.

Von den untersuchten Rindern, meist im Alter von etwa 2 Jahren, stammten 108 aus der Bundesrepublik und 142 aus der DDR. Unmittelbar nach dem Schlachten wurde von jedem Schwein eine halbe Niere, vom Rind ein etwa faustgroßes Nierenstück und ein etwa gleichgroßes Stück Muskulatur aus dem Nierenzapfen entnommen. Die Entnahme erfolgte nach abgeschlossener Fleischuntersuchung unter Wahrung steriler Bedingungen, und die Proben wurden in Plastiktüten verpackt.

Schon 3 Stunden nach der Entnahme wurden die entnommenen Nieren- und Muskelstücke nach der Methode des amtlich vorgeschriebenen Hemmstofftestes (HT) auf das Vorhandensein von Hemmstoffen untersucht. Diejenigen Proben, bei denen der Test "negativ" verlief,

wurden zur weiteren Analyse halbiert und jeweils eine Hälfte bei Zimmertemperatur (ca. 20° C) und Kühlschranktemperatur (5° C) aufbewahrt. Von diesen Proben wurde mit Bac. subtilis Stamm BGA als Testkeim nach bestimmten Zeiten der Lagerung der mikrobiologische Hemmstofftest angestellt.

Zur besseren Übersicht ist dieser Untersuchungsplan in der nachfolgenden Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Untersuchungsplan der bei verschiedenen Temperaturen gelagerten Proben

Material	Aufbewahrung	Zeitpunkt der Untersuchung
Niere und Muskulatur	= + 15° C	am Schlachttag (3 Std. nach Schlachtung)
Niere und Muskulatur	Zimmertemperatur (ca. 20° C)	täglich vom 4. bis zum 7. Tag
Niere und Muskulatur	Kühlschranktemperatur (ca. 5° C)	jeden 2. Tag für die Dauer von 3 Wochen

Die bei den nach diesem Schema durchgeführten Untersuchungen isolierten Keimarten wurden anschließend mit Bacillus subtilis als Testkeim auf antibiotische bzw. antagonistische Eigenschaften überprüft.

3.2. Methodik

3.2.1. Der Hemmstofftest (HT)

Vom Arbeitskreis lebensmittelhygienischer tierärztlicher Sach-

verständiger (ALTS) wurde eine Anweisung für die Durchführung dieses Testes erarbeitet (1971) und von LEVETZOW (1973) zusammengefaßt. Im Unterschied zu den jetzt verbindlich vorgeschriebenen Untersuchungsanweisungen der Anlage 4 zur geänderten AB.A (1975) wurde der Hemmstofftest in der folgenden Methodik durchgeführt:

a) Untersuchungstechnik

Auf die vorbereiteten Nährböden wurden erbsengroße Stücke Nierenrinde bzw. Muskulatur aufgelegt und mindestens 18 Stunden bei + 30° C bebrütet.

Ein in gleicher Weise präparierter Nährboden ohne Gewebsmaterial wurde als Kontrolle mitbebrütet. Eine auftretende Hemmzone wurde zwischen Gewebsstück und Wachstumsgrenze mit einem Stechzirkel ausgemessen.

b) Beurteilung

Jede zweifelsfrei erkennbare Wachstumshemmung von mindestens 1 mm wurde als positiv bewertet. In den Befund wurde die Ausdehnung der Hemmzone in mm aufgenommen.

c) Nährboden

Als Nährboden wurde Standard II Nähragar MERCK oder ein anderer gleichwertiger Trockennährboden mit einem pH-Wert 8,0 und 6,0 im Doppelansatz verwendet. Die Präparation des Nährbodens für den Hemmstofftest erfolgte in der Weise, daß zu 500 ml verflüssigtem und auf + 50° C abgekühltem Agar 0,5 ml Sporensuspension des Testkeimes unter Schütteln zugefügt wurden. Das erhaltene Gemisch wurde in Petrischalen ausgegossen.

Der so präparierte Nährboden war bei Kühlschrankaufbewahrung (+ 3 bis 5° C) bis zu drei Wochen verwendungsfähig. Um ein Überwuchern des Hemmhofes zu verhindern, was insbesondere in der zweiten Bebrütungsphase der Fall sein konnte, wurden nach LEVETZOW (1973) die aus dem Kühlschrank entnommenen Testplatten vor dem Aufleben des Untersuchungsmaterials 30 bis 60 Minuten bei 37° C im Brutschrank vorgetrocknet.

d) Herstellung der Sporensuspension

Standard II Nähragar MERCK oder ein anderer gleichwertiger Trockennährboden wurde nach massiver Ösenbeimpfung 10 Tage bei + 30° C bebrütet. Danach erfolgte Abschwemmung mit steriler physiologischer NaCl-Lösung.

Wir haben die Sporensuspension durch Anzüchtung des in lyophilisierter Form vom BGA Berlin bezogenen Bac. subtilis-Stammes auf dem in Roux-Schalen ausgegossenen Nährboden mit einem pH-Wert von 7,2 hergestellt. Das Ausstreichen auf Petrischalen hat sich wegen der starken Austrocknung und der sich daraus bei der späteren Abschwemmung der Kolonien ergebenden Schwierigkeiten nicht sonderlich gut bewährt.

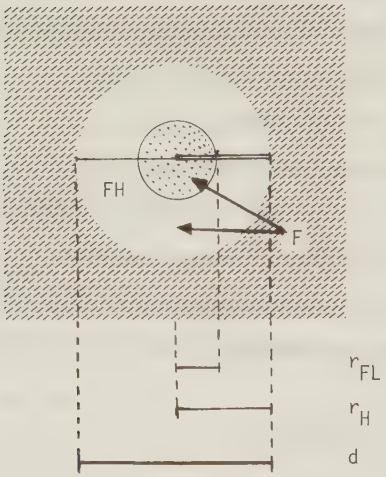
Die erhaltene Suspension wurde bei 3.000 U/Min 10 Minuten lang zentrifugiert. Das Sediment in steriler physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen und abermals 10 Minuten bei 3.000 zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde sterile physiologische NaCl-Lösung zugegeben und 30 Minuten bei + 70° C erhitzt. Die so gewonnene Sporensuspension wurde auf eine Dichte von ca. 10^7 Sporen pro ml drop-plating eingestellt (UNTERMANN, 1970).

Die Auswertung erfolgte nach 24stündiger Inkubation bei 30^{o} C. Die Keimsuspension konnte im Kühlschrank bei einer Temperatur von etwa + 4^{o} C für 2 bis 3 Monate aufbewahrt werden.

e) Auswertung der Ergebnisse

Die Hemmzonen habe ich mit Hilfe eines Stechzirkels ausgemessen. In Zweifelsfällen geschah dies unter Zuhilfenahme einer Lupe oder eines Plattenmikroskopes. Für die Auswertung des Testes wurden Werte entsprechend der Begriffsbestimmung von ROTH (1971) eingesetzt (Abb. 1). Die Hemmzone entspricht dem Wert r_H ./. r_{FL}.

Abb. 1: Definition des Hemmhofes



d = Durchmesser des Hemmhofes in mm

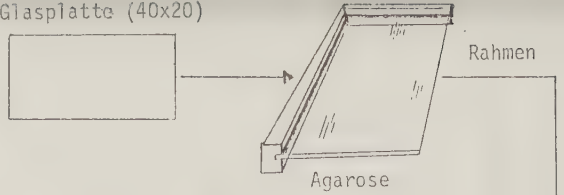
F = Gesamthemmhoffläche = Hemmhoffläche + Auflagefläche der ausgestanzten Fleischproben in mm^2

rH = Abstand von der ausgestanzten Probe bis zum Beginn der Bakterienwachstumszone in mm

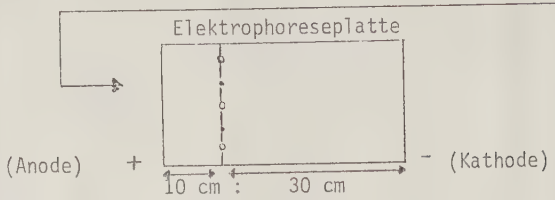
FH = Hemmhoffläche (Hemmzone mm^2)

rFl = Radius der ausgestanzten Fleischproben in mm

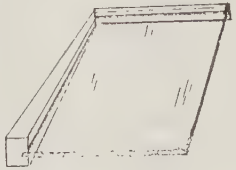
a) Herstellung des Laufmediums



b) Elektrophorese 1000 Volt, 2 h



c) Mikrobiologie 16-18 h, 37° C



Überschichtung des Laufmediums mit Bakterienagargemisch pH 6,0 pH 8 (Bac. subtilis BGA, Antibiotika-Nachweismedium / Seed Agar)

Abb. 2: Schematische Darstellung des Arbeitsganges beim MC-Test nach ROTH (1971)

3.2.2. Mikrobiologisch-chemische Verfahren zum Nachweis von Antibiotika (MC-Test)

Der MC-Test zum Nachweis von Hemmstoffen besteht aus zwei Arbeitsgängen:

a) Elektrophoretische Auftrennung des Lösungsgemisches, das die fraglichen Hemmstoffe enthält,
b) Kombination mit dem eigentlichen Hemmstofftest, d.h. Überschichtung des elektrophoretisch aufgetrennten Ansatzes von 1. mit der Testkeimaufschwemmung, Bebrütung und Identifizierung fraglicher Hemmstoffe auf Grund ihrer Laufstrecken, die durch die Lokalisierung der jeweiligen Hemmhöfe wiedergegeben werden.

Das Prinzip des Verfahrens, wie es zuerst von ROTH (1971) vorgeschlagen wurde, ist in Abb. 2 dargestellt.

3.2.2.1. Objektträgerverfahren, Kurzzeitniederspannungselektrophorese (LANGNER et al., 1973)

Die Technik wurde in orientierenden Versuchen mit einer Reihe von Test-Antibiotika reproduziert. Als Laufmedium diente Agarose 1,5 %ig in Phosphatpuffer bei einer Ionenstärke von 0,5. Dazu wurde ein 0,067 m-Phosphatpuffer mit einem pH von 5,5 nach SÖRENSEN im Verhältnis 1 : 4 mit Wasser (Aqua dest.) verdünnt. Das Laufmedium wurde bei ca. 60° C in den üblicherweise verwendeten Plastikgießrahmen auf einer völlig waagerechten Unterlage mit einer Schicht-

dicke von 1,7 mm ausgegossen. Nach dem Ausgießen wurden die Objektträger bei 5^{o} C gekühlt.

Die Reinsubstanzen (Vergleichs- bzw. Kontroll-Lösungen) wurden mit einer automatischen 1,6 µl Spritze auf die erstarrte Agarose-Schicht auf einer Linie im anodischen Drittel des Objektträgers aufgetragen. Die so vorbereiteten Objektträger wurden direkt auf die Elektroden aufgelegt.

Zur Pufferung diente 0,067 m-Phosphatpuffer mit einem pH von 5,5. Der Puffer wurde während der Elektrophorese unter Kühlung umgewälzt, um Konzentrationsänderungen zwischen Kathode und Anode zu verhindern. Die Gelschicht wurde mit Petroläther (SB 30 - 40^{o} C) auf konstant 4^{o} C gekühlt. Die Spannung betrug konstant 450 Volt und die Elektrophoresezeit 5 - 30 Minuten, abhängig vom Antibiotikum. Wenn mehrere verschiedene Antibiotika verwendet wurden, waren also auch mehrere Ansätze mit verschiedener Laufzeit erforderlich.

Anschließend Überschichtung der Objektträger mit vorbereiteter Agar-Sporensuspension mit pH 6,0 und 8,0 (S.37,3.2.1.c. "Nährboden"). 2 Stunden bei 4^{o} C und 18 Stunden Bebrütung bei 37^{o} C. Ausmessung der Laufstrecken vom Start- (=Auftrags)punkt bis Hemmhofmitte.

a) Auftrennung von Gewebsflüssigkeit

Die hochspannungselektrophoretische Trennung der Antibiotika-Rückstände im Fleisch und in der Niere erfolgte mit einer am Institut für morphologische und funktionelle Veterinärpatholo-

gie der Freien Universität Berlin entwickelten Elektrophoresekammer, die von der Fa. CAMAG hergestellt wird. Das System wird nachfolgend in seinen Arbeitsteilen beschrieben: Zur Herstellung des Laufmediums wurden in die Plastikrähmchen 40 x 20 cm große rechteckige Glasplatten eingelegt. Diese wurden mit einem Gel-Laufmedium, bestehend aus 20 %iger Agarose (SERVA), dem ein Phosphatpuffer pH 5,5 (SÖRENSEN) im Verhältnis 1 : 10 zugefügt war, beschichtet. Bevor die Agarose aufgebracht wird, wurde die Glasplatte in ein eigens dafür entwickeltes Rahmengestell eingespannt. Von größter Wichtigkeit war dabei, daß das Rahmengestell auf völlig ebener, mit der Wasserwaage justierter Fläche mit dem Agarose-Phosphat gleichmäßig beschichtet wurde. Es waren dazu 160 - 165 ml des auf 60° C abgekühlten noch flüssigen Gemisches erforderlich. Nach dem Erstarren dieses Gemisches entstand eine Schichthöhe von 2 mm, die auch der im Hemmstofftest vorgeschriebenen Schichtdicke entspricht.

Die erstarrte Agaroseschicht wurde mit einem Skalpell an dem Plastikrahmen entlang losgelöst und die Glasplatte aus dem Rahmen herausgezogen. Die so erhaltenen Platten wurden im Verhältnis 1 : 3 aufgeteilt; dadurch wurde eine Auftragungslinie geschaffen, die 10 cm von der Anode und 30 cm von der Kathode entfernt war.

Zur Aufbringung der Fleisch- und Nierenproben wurden wie beim Hemmstofftest die zur Untersuchung vorgesehenen Proben in erbsen-

bis bohnengroße Stücke zerteilt und in einer Auftragungslinie mit Abstand von 6 cm auf die Agaroseschicht aufgelegt.

Zur Durchführung der Hochspannungselektrophorese CAMAG wurde die mit Fleisch- und Nierenproben beschichtete Agaroseplatte in die Hochspannungselektrophoresezelle eingelegt. In der Zelle wurde ein Gleichstrom durch Pufferkästen mit 10 %igem Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 5,5 geleitet und der Strom beiderseits auf die Agaroseschicht mit puffergetränktem Stromübertragungsstreifen übertragen (sog. Rayondochte). Das Untersuchungsmaterial wurde dabei einer Spannung von 1.000 Volt bei einer Stromstärke von 40 - 50 mA für die Dauer von zwei Stunden ausgesetzt. Die während des Reaktionsablaufes entstehende Wärmeentwicklung wurde mittels eines Kühlsystems mit Äthanol so vermindert, daß im Laufmedium eine Temperatur von annähernd $\pm$ 0^{o} C herrschte. Das Kühlsystem wurde 5 Minuten vor der Entnahme der Platten auf + 4^{o} C eingestellt, um ein Anfrieren der Elektrophoreseplatten oder eine unerwünschte Kondenswasserbildung zu verhindern.

b) Mikrobiologischer Hemmstoffnachweis nach der Auftrennung

Die der CAMAG-Kammer entnommenen Agaroseplatten wurden nach Abnahme der Fleisch- und Nierenproben in den Plastikrahmen eingeschoben. Jede Platte wurde mit 180 ml eines Bakterien-Agargemisches, wie für den Hemmstofftest vorgeschrieben, im Doppelansatz der pH-Werte von 6,0 und 8,0 überschichtet. Auch hier war

peinlich genau auf die Einhaltung der Schichtdicke von 2 mm zu achten. Nach 16 - 18-stündiger Bebrütung bei 30° C bildeten sich bei den positiven Proben in ziemlich einheitlicher Entfernung von der Auftragungslinie ovale und gut abgegrenzte Hemmhofflächen aus. Gemessen wurde der Abstand zwischen der äußeren Begrenzung der entstandenen Hemmhoffläche und der Auftragungslinie in Millimetern. Die ermittelten Strecken wurden mit denen verglichen, die in entsprechenden Kontrollansätzen mit Testsubstanzen bekannter Zusammensetzung erhalten worden waren.

3.2.3. Methodik der Flora-Analyse in verkeimten hemmstoffnegativen Proben

3.2.3.1. Auswahl der Proben

Fleisch- und Nierenproben von Schweinen und Rindern, bei denen die erste Untersuchung auf Hemmstoffe unmittelbar nach der Schlachtung negativ verlaufen war, wurden auf die hemmende Wirkung unspezifischer Keime und ihrer Stoffwechselprodukte gegenüber Bac. subtilis BGA untersucht. Dazu wurden die Proben (Niere, Muskulatur) in Plastiktüten je einmal 21 Tage bei 4° C und einmal bei etwa 20° C eine Woche gelagert. Die bei 20° C gelagerten Proben wurden täglich und die im Kühlschrank gehaltenen Proben alle 2 Tage im Doppelansatz bei pH-Werten von 6,0 und 8,0 untersucht.

Traten bei den wiederholten Untersuchungen Hemmzonen auf, dann wurde versucht, die kontaminierenden Mikroorganismen nach folgendem Untersuchungsgang zu isolieren:

a) Die meist in Mischkulturen vorliegenden Keime wurden erneut auf sporenhaltige Testnährböden beider pH-Bereiche überimpft; 24 Stunden Bebrütung bei 37° C zur Untersuchung, ob hemmende Aktivitäten bei den gewachsenen Kolonien nachweisbar waren.
b) Die in dieser Untersuchung "positiven" Organstückchen wurden ebenfalls auf neue Testnährböden umgesetzt, um zu prüfen, ob sie auch nach der vorhergegangenen Bebrütung Hemmhöfe zu bilden vermochten.
c) Vom entsprechenden Ausgangsmaterial (also noch nicht bebrütet) wurden erneut Hemmstoffuntersuchungen durchgeführt.

3.2.3.2. Isolierung von Kontaminanten mit inhibitorischer Aktivität

Es wurden bei mikrobiell verunreinigten, nicht auswertbaren positiven Proben etwa vorhandene Kontaminationsbakterien von dem korrespondierenden Muskel- oder Nierenstückchen abgeimpft. Die am Rande der Gewebsstückchen isolierten Bakterien-Kolonien wurden mit einer sterilen Öse entnommen, auf einer Standard II-Nähragar-Platte (MERCK) ausgestrichen und 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Danach wurden sie auf Schrägagarröhrchen (Standard II-Nähragar) überimpft.

Um auch eine quantitative Bestimmung der einzelnen Floraanteile in Gewebe- und Organproben zu ermöglichen, wurde nach der Methodik

von REUTER (1968) gearbeitet. Sie umfaßt:

a) Die Aufbereitung des Untersuchungsmaterials

b) Die Kultivierung der einzelnen Keime

c) Die Identifizierung der Mikroorganismen

Zur Aufbereitung der Proben wurde das Untersuchungsmaterial im Verhältnis 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, die 0,1 % Pepton und 0,075 % Pulver-Agar (MERCK) enthielt. Der Agarzusatz ermöglichte es, mit dem Tropfverfahren zu arbeiten. Das Homogenisieren des Materials erfolgte steril mit dem Ultra-Turrax bei 15.000 bis 20.000 U/Min. Der Schaft des Ultra-Turrax wurde nach jedem Gebrauch für 20 Sekunden zur Entkeimung in kochendes Wasser getaucht. Ein weiteres Gefäß mit siedendem Wasser wurde zum Abspülen verwendet, und ein drittes Gefäß mit sterilem kühlem Wasser diente schließlich zum Abkühlen des Schaftes.

Aus dem Homogenisat wurde 1 ml Material entnommen und mit 9 ml steriler Verdünnungsflüssigkeit im Röhrchen mittels eines Whirl-Mix vermischt. In der gleichen Weise wurden weitere Verdünnungen in Zehnerpotenzen nach guter Vermischung der jeweils niedrigeren Verdünnungsstufe mit steriler Verdünnungsflüssigkeit hergestellt.

Wegen entscheidender Vorteile, nämlich der höheren Anwachsrate, der besseren Ablesbarkeit und für Nachfolgeuntersuchungen bes-

seren Erfolg versprechenden Möglichkeiten wurde zur Kultivierung das Oberflächenverfahren bevorzugt. Dabei wurden zwei verschiedene Modifikationen angewandt:

α) Spatelverfahren: Dabei wurden Verdünnungen des Homogenisats auf sporenhaltigen Testnährböden beider pH-Bereiche mittels Drigalski-Spatel ausgespatelt und dann in verschiedenen Temperaturbereichen bebrütet. Die Vortrocknung der Platten erwies sich dabei als unerläßlich, um Fehlergebnisse durch Kondenswasserbildung zu vermeiden.

Bei diesem Verfahren ließ sich leicht herausfinden, welche Kolonien bzw. Keimarten in den Mischpopulationen Hemmhöfe erzeugten und in welcher Menge sie im Ausgangsmaterial vorlagen. Das Verdünnungs- und Beimpfungsschema ist in der Abbildung 3 dargestellt.

Die beimpften Nährböden wurden je zur Hälfte bei + 10° C für zwei bis drei Tage gehalten und erst dann 18 bis 24 Stunden bei + 37° C bebrütet. Die Aufbewahrung bei der niedrigen Temperatur ermöglichte es den psychrophilen Mikroorganismen, besser zu wachsen als der Testkeim und sie erlangen so durch Vordiffusion der von ihnen gebildeten Hemmstoffe einen Vorsprung gegenüber dem bei + 37° C wesentlich schneller wachsenden Bac. subtilis.

β) Tropfverfahren: Zur Trennung und Bestimmung einzelner hemmstoffaktiver Mikroorganismen wurde das Tropfverfahren angewandt. Da-

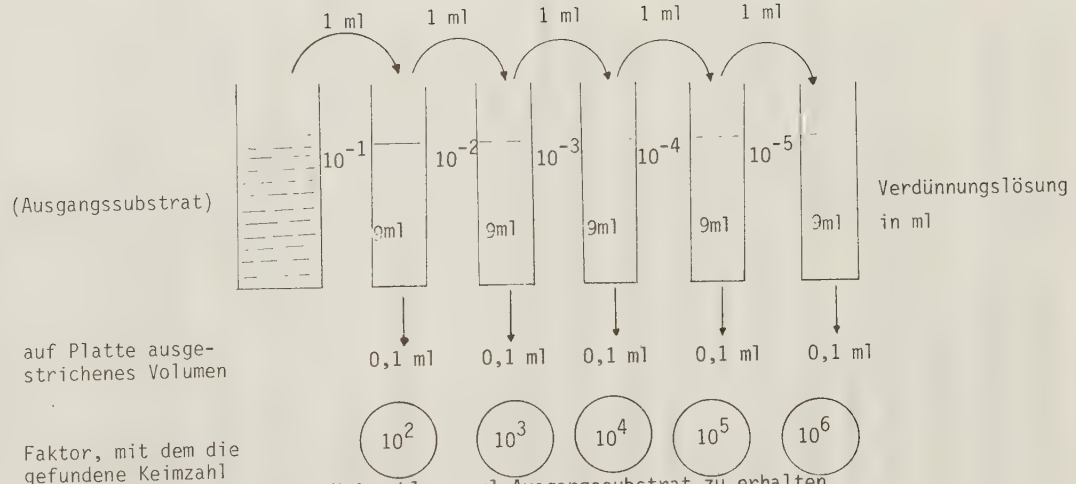


Abb. 3: Schematische Darstellung des Verdünnungs- und Ausimpfungsschemas für die quantitative Analyse der Keimflora (Spatelmethode)

zu wurden jeweils 0,05 ml aus jeder Verdünnungsstufe auf einen Sektor einer gut vorgetrockneten Selektivplatte aufgetropft. Der Vorteil dieses Verfahrens ist es, daß auf einer Platte sechs Verdünnungsstufen untersucht werden können. Dies bedeutet im Vergleich zum Spatelverfahren einen wesentlich sparsameren Nährbodenverbrauch. Zur vorläufigen Gruppierung der isolierten Keime wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Medien verwendet.

Als brauchbarster Weg zur Erzielung von Reinkulturen erwies es sich, zunächst mit Hilfe des Spatelverfahrens hemmende Kolonien herauszufinden und diese dann, da es sich fast immer um Mischkulturen handelte, mit Hilfe der drop-plate-Technik auf den üblichen Selektivmedien zu isolieren.

Die so erhaltenen Reinkulturen wurden zur Kontrolle mehrmals auf ihr Hemmvermögen gegenüber Bac. subtilis getestet und im positiven Falle auf Schrägagar oder in Stichkulturen bis zur endgültigen Differenzierung aufbewahrt.

3.2.3.3. Identifizierung von Reinkulturen

Die Differenzierung der isolierten Stämme aus den Gewebs- und Organproben erfolgt nach den Angaben von COWAN und STEEL (1965); BAIRD-PARKER (1966); CARPENTER et al. (1966); HARRIGAN und MC CANCE (1966); SCHMIDT-LORENZ (1965); MÜLLER (1969); KUNDRAT (1968). Die Untersuchung umfaßte folgende Einzelschritte:

Tabelle 2: Zusammenstellung der Selektivmedien zur Identifizierung der einzelnen Keime nach REUTER (1968 und 1970)

Nährboden	Keimart	Zusammensetzung	Temperaturen	Bebrütungszeit
ISO ("PFHG")	Gesamtkeimzahl, psychrophile Keime	-	4 - 6° C	3 - 8 Tage
MOSSEL	Bazillen	Eigelb	35° C	24-48 Std.
LA	Gesamtkeimzahl, Lactobaz.	-	37° C semianaerob	48 Std.
LS	Gesamtkeimzahl, Lactobaz.	Sorbinsäure	37° C	48 Std.
VL	Enterobacteriaceae	Violet-Red-Bile 1 % Lactose	37° C	24 Std.
VG	Enterobacteriaceae	Violet-Red-Bile 1 % Glucose	37° C	24 Std.
EN	Enterokokken	TTC Triphenyltetrazoliumchlorid	37° C	48 Std.
KRANEP	Mikrokokken	Eigelbsuspension, Na-acid, Actidione	37° C	48 Std.
W (Würze)	Hefen u. Schimmelpilze	Biervorderwürze	24° C 32° C	2 - 10 Tage
SPS	Clostridien	Sulfit-Polymyxin B-Sulfat-Sulfadiazin	37° C anaerob (Paraffin)	48 Std.
GSP	Pseudomonaden	Glutamat-Stärke Phenolrot	30 - 32° C	48 Std.

Gramfärbung: Herstellung eines luftgetrockneten Objektträgerausstriches von einer höchstens 24 Stunden alten Kultur und Hitzefixierung

Färbung:

- 1 Minute mit Ammoniumoxalat-Kristallviolettlösung (Kristallviolett 2 g, Ammoniumoxalat 0,8 g, Äthylalkohol 95 %ig 20 ml, Aqua dest. 80 ml)
- 2 Sekunden mit Wasser abspülen
- 1 Minute Lugol'sche Lösung einwirken lassen (Jod 1 g, KJ 2 g, Aqua dest. 300 ml)
- Abspülen mit Wasser, abtrocknen
- Entfärben mit Alkohol 95 % 30 Sekunden, abtrocknen
- Gegenfärbung mit Safraninlösung 10 Sekunden (2,5 %ige Safraninlösung in 95 % Alkohol 10 ml, Aqua dest. 100 ml)
- Abspülen, abtrocknen

Anschließend an die Färbung wurden die Kulturen mikroskopisch auf Reinheit geprüft und die isolierten Stämme morphologisch differenziert.

A) Differenzierung der gramnegativen Bakterien

Sämtliche Kulturen wurden zunächst auf das Vorhandensein von Katalase überprüft. Danach erfolgte eine Anzüchtung über 24 Stunden bei 37° C auf Endo-Agar. Außerdem wurden die Stämme über 5 Tage lang bei 37° C in Gentianaviolett-Galle-Lactose-Peptonbouillon inkubiert. Danach wurden folgende biochemische Re-

aktionen geprüft:

a) Wachstum und Beweglichkeit bei Kühlschrank (4^{o} C)-, Zimmer- und Brutschrank (37^{o} C)-Temperatur;

b) Oxydase-Bildung

c) Dextrose-Spaltung bei Zimmertemperatur und bei 37^{o} C

d) Fermentations-Oxydationstest nach HUGH und LEIFSON (1963) bei Zimmertemperatur und bei 37^{o} C

e) Harnstoffspaltung

f) Nitratreduktion

g) Wachstum auf MAC CONKEY-Agar (1908)

g) Indolbildung-Kovacz-Reagenz als Indikator

i) Verwertung von Ammoniumcitrat als alleinige Kohlenstoff-Quelle, SIMMONS (1926)

k) Verhalten auf KLIGLER-Agar mit Harnstoffzusatz, BADER (1951)

l) Voges-Proskauer-Test, Nachweis von Acetylmethyl-Carbinol und dem Methylrottest, MERCK (1974)

m) Spaltung von Mannit, Sorbit, Inosit, Rhamnose und Arabinose (Filterblättchenmethode)

n) Gelatine-Verflüssigung

o) Hydrolyse von Stärke, Casein und Tributyrin

B) Differenzierung der grampositiven Bakterien

Eine Vordifferenzierung der grampositiven Keime wurden folgendermaßen durchgeführt:

Sämtliche grampositiven Keime wurden wie gramnegative Bakterien auf Katalasebildung, Gelatine-, Casein-, Stärkeabbau, auf

die Bildung von Acetylmethylcarbinol, Säurebildung mittels Methylrot und die Reduktion von Nitrat untersucht. Außerdem wurden sie auf Harnstoffabbau nach CHRISTENSEN (1946) und auf Verhalten in Lackmusmilch geprüft.
Nach dem Ausfall dieser Vordifferenzierung wurden zusätzlich folgende Reaktionen untersucht:

a) Wachstum von Fäkalstreptokokken auf dem sogenannten KF-Agar, KENNER et al. (1961)
b) Wachstum von Mikro- und Staphylokokken auf dem Selektivagar nach BAIRD-PARKER (1962) und im sogenannten OF-Test (1966) sowie Prüfung auf Koagulasebildung
c) Aerobe Sporenbildner wurden zuerst einmal nach BARTHOLOMEW und MITTWER (1950) gefärbt und nach ihren Merkmalen gemäß BERGEY (1974) differenziert

3.2.3.4. Prüfung der antagonistischen Wirkung isolierter Stämme gegenüber Bac. subtilis BGA:

Das bereits beschriebene Sporenagargemisch von Bac. subtilis BGA wurde im Doppelansatz bei pH 6,0 und pH 8,0 für die Testmethode verwendet. Auf den vorbereiteten Hemmstoffplatten wurde mit Hilfe einer Schablone in regelmäßigen Abständen jeder fragliche Stamm so ausgestrichen, daß die Impfstriche etwa 8 mm Durchmesser hatten. Nach 18 Stunden Bebrütung bei 30^{0} C wurden die Platten im durchfallenden Licht untersucht und die auftretenden Hemmzonen ausgemessen.

3.2.4. Prüfung der Dialysierbarkeit von Hemmstoffen aus verkeimtem Organmaterial

Das Organmaterial, aus dem die unter 3.2. (S.47) isolierten und später aus inhibitorisch wirksam erkannten Stämme isoliert worden waren, wurde eingefroren und bis zur weiteren Untersuchung bei - 20° C aufbewahrt. Nach endgültiger Differenzierung der Stämme wurde dieses Material in folienbedeckten sterilen Gläsern aufgetaut. Die dabei auftretende Gewebsflüssigkeit wurde dann tropfenweise auf die sporenhaltigen Testnährböden verbracht, die mit Dialysemembranen bedeckt waren. Verwendet wurden dazu Dialysemembranen der Fa. KALLE mit durchschnittlicher Porengröße von 25 bis 80 Å (Kal 42). In Kontrolluntersuchungen hatten sich diese Dialysemembranen als nicht bakterizid erwiesen. Die Beurteilung etwa gebildeter Hemmhöfe erfolgte wie üblich nach 24-stündiger Bebrütung bei 37° C.

3.3. Untersuchungsergebnisse

3.3.1. Der Nachweis von Hemmstoffen bei gesunden Schlachttieren

Von den am Schlachthof Berlin-Spandau geschlachteten 1.200 Tiere waren nur in sehr geringem Ausmaß durch den Hemmstofftest positive Hemmstoffwerte nachzuweisen. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 3 zusammengestellt.

Der Anteil der hemmstoffpositiven Reagenten liegt damit ungewöhnlich niedrig. Doch entspricht dies Ergebnis dem seit 1972 erkennbaren Trend zur Abnahme der positiven Hemmstoffnachweise bei Schlachttieren.

Tabelle 3: Im Hemmstofftest nachgewiesene Hemmstoffe bei Schlachttieren
Januar bis September 1973
am Schlachthof Berlin-Spandau

Tierart	untersuchte Tiere	positive Tiere	%
Schwein	950	16	1,68
Rind	250	1	0,4

In diesen Untersuchungen wurden die meisten positiven Befunde bei Nierenmaterial erhoben.

In den nachfolgenden Tabellen 4 a und 4 b sind die Untersuchungsergebnisse nach Geweben und dem beim Hemmstofftest verwendeten pH-Wert aufgeschlüsselt.

In der Tabelle 4 a fällt weiterhin auf, daß bei der Untersuchung von Schweinenieren im Doppelansatz auf Nährböden mit pH 6,0 und 8,0 im sauren Milieu mehr positive Reagenten erfaßt wurden als im alkalisierten Nährboden. Dabei umfassen die 16 positiven Nierenbefunde (pH 6,0) beim Schwein die Gesamtzahl aller überhaupt positiv reagierenden Individuen, d.h. daß die Proben, die bei pH 8,0 positiv reagierten, ebenso wie die 13 (bzw. 11) Muskelproben aus diesem Kollektiv und nicht etwa von anderen Schweinen stammen. Die Größe der Hemmhöfe zeigte eine gewisse Abhängigkeit vom pH-Wert des verwendeten Substrates. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 zusammengestellt.

Es zeigt sich, daß auf den Nährböden mit pH 6 regelmäßig stärker ausgeprägte Hemmhöfe vorlagen als auf dem alkalischen Medium, und zwar besonders in den Fällen einer stärker inhibitorischen Aktivität, d.h. also bei größeren Hemmhofdurchmessern.

3.3.2. Ergebnisse der Untersuchungen über die Spezifität der im Hemmstofftest als positiv bewerteten Proben

Bei den Untersuchungen der im Hemmstofftest als positiv bewerteten Fleisch- und Nierenproben mittels des MC-Testes stellten wir

Tabelle 4: Ergebnisse der Untersuchung von Nieren- (a) und Muskelproben (b) im Hemmstofftest

a) Nierenproben

Tierart	untersuchte Nieren	positive Nieren		% +)
		pH 6,0	pH 8,0	
Schwein	950	16	13	1,68
Rind	250	1	1	0,4

b) Muskelproben

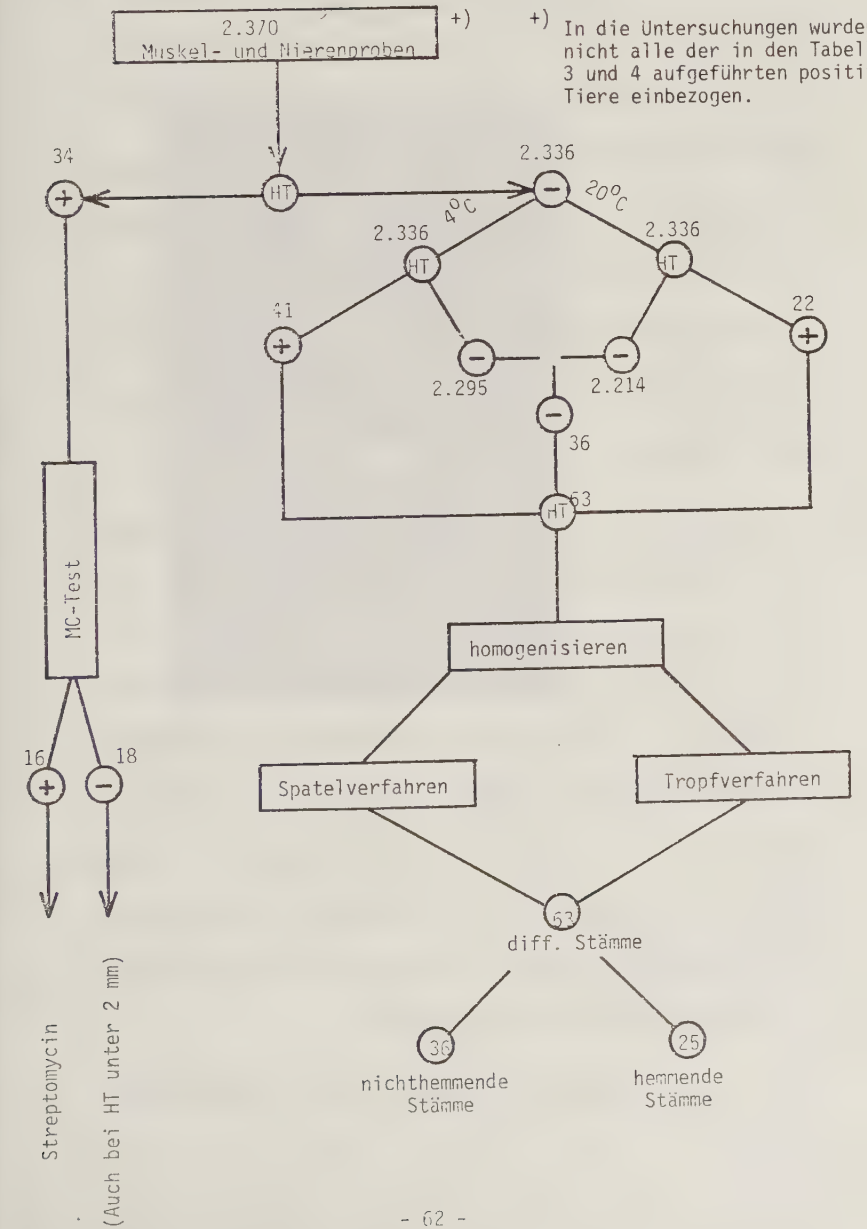
Tierart	untersuchte Muskulatur	positive Muskulatur		% +)
		pH 6,0	pH 8,0	
Schwein	950	13	11	1,36
Rind	250	0	0	0

+) Die Prozentangaben beziehen sich immer auf den jeweils höheren Wert

Tabelle 5: Häufigkeit unterschiedlicher Hemmzonen bei verschiedenen pH-Werten

Organ	positive Fälle insgesamt		Hemmhofgröße in mm							
			1		2		3		4	
	pH 6,0	pH 8,0	pH 6,0	8,0	6,0	8,0	6,0	8,0	6,0	8,0
Niere	16	13	8	6	5	4	2	2	1	1
Muskel	13	11	7	6	4	3	2	2	0	0

Abb. 4: Untersuchungsgang zur Isolierung inhibitorischer Bakterienstämme aus Muskel- und Nierenproben



bei 8 von insgesamt 17 Fällen eindeutig positive Werte fest. Der Vergleich zu den standardisierten Antibiotika-Kontrollen wies dabei auf das Vorliegen von Streptomycin hin. Bei den anderen 9 hemmstoffpositiven Proben gelang eine elektrophoretische Abtrennung und Identifizierung irgendeiner antibiotischen Substanz nicht. Es muß also offen bleiben, ob die hier beobachteten Reaktionen tatsächlich auf das Vorhandensein eines Rückstandes oder möglicherweise auf andere Ursache zurückgeführt werden müssen. Für die Bewertung einer positiven Reaktion ist in diesem Zusammenhang die Tatsache wichtig, daß sämtliche der im MC-Test negativ ausgefallenen Proben im Hemmstofftest Hemmzonen aufgewiesen hatten, die unter 3 mm lagen.

3.3.3. Antagonistische Wirkungen von Mikroorganismen aus kontaminierten Proben auf den Teststamm Bac. subtilis BGA

3.3.3.1. Häufigkeit unspezifischer Hemmwirkungen

Insgesamt 2.370 Proben, es handelte sich um 934 Nieren- und 937 Muskelproben von Schweinen sowie um 249 Nieren- und 250 Muskelproben vom Rind, wurden auf antagonistische bzw. antibiotische Wirkung gegen Bacillus subtilis BGA untersucht. Die Verkeimung war durch Lagerung des in Plastiktüten verpackten Materials bei Zimmertemperatur und im Kühlschrank provoziert worden. In Abbildung 4 ist noch einmal der gesamte Arbeitsgang von der Probeentnahme bis zur Differenzierung der Keime dargestellt.

Bei 63 dieser Proben (= 2,66 %) waren deutlich ausgeprägte Hemm-

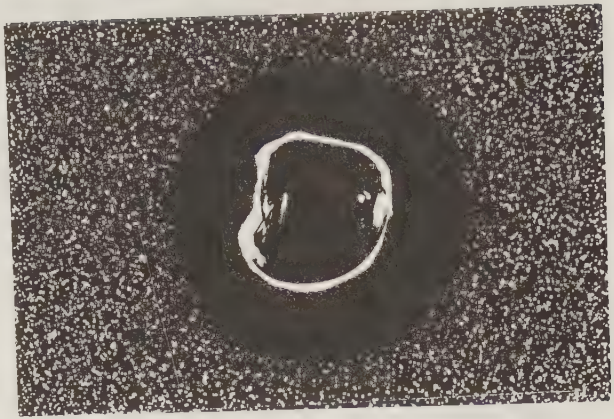


Abb. 5: Hemmhofbildung bei einer kontaminierten Probe (Kontaminationsflora als schmaler, heller Rand erkennbar)

höfe festzustellen. Davon waren die meisten Fälle (41 = 1,73 %) bei Lagerung der Proben im Kühlschrank bei 5^{o} C beobachtet worden. Aber auch bei Zimmertemperatur aufbewahrte Proben (22 = 0,93 %) ließen derartige Hemmzonen erkennen.

Bei fast allen bei Zimmertemperatur aufbewahrten Proben entwickelte sich schon innerhalb von 24 Stunden ein starker Keimgehalt, der zum Teil so hoch war, daß es zu Überwucherungen des Teststückes bis weit in die Peripherie kam. Ein gleicher Keimgehalt war bei den bei Kühlschranktemperaturen gehaltenen Proben erst nach Ablauf von 2 bis 3 Tagen zu verzeichnen. Ganz besonders in den warmen Märztagen 1973 und während der Sommermonate waren bei diesen stark verkeimten Proben in mehreren Fällen mehr oder weniger starke Hemmhöfe zu beobachten. Dies Phänomen zeigt sich besonders dann, wenn sich das Wachstum der Kontaminationsflora auf das getestete Organstückchen beschränkte (Abb.5) und sich nicht weiter über den mit dem Testkeim beimpften Nährboden verbreitet hatte.

3.3.4. Isolierung und Eigenschaften inhibitorisch wirksamer Stämme

Die für die beobachteten Hemmwirkungen als ursächlich vermuteten Bakterienstämme wurden durch Spateln oder Auftropfen von Gewebshomogenat-Verdünnungen auf dem HT-Agar-Sporengemisch vereinzelt, so daß die Hemmwirkungen gesondert beurteilt und verdächtige Stämme isoliert werden konnten.

Die dabei herausgezüchteten 63 Stämme wurden zunächst differenziert.

Unter ihnen waren zahlreiche gramnegative und -positive Arten einschließlich einiger Staphylokokken- und Streptokokkenstämme. Die Versuche, mit diesen Kulturen die Hemmwirkung gegenüber dem Bac. subtilis-Teststamm zu reproduzieren, gelangen jedoch nur bei einem Teil des Materiales. Eine ganze Reihe von Stämmen erwies sich bei wiederholten Prüfungen nicht mehr als inhibitorisch, so daß keine weiteren Untersuchungen mehr damit angestellt wurden. Auffälligerweise betraf diese mangelnde Reproduzierbarkeit nicht nur die Mehrzahl der grampositiven Keime sondern auch einen Teil der gramnegativen, vor allem auch die isolierten Proteusstämme.

Übrig blieb schließlich ein Kollektiv von 25 gramnegativen Stämmen, bei denen der Hemmeffekt gegenüber Bac. subtilis BGA auch nach wiederholten Passagen regelmäßig und in gleichbleibender Stärke reproduziert werden konnte. Die Herkunft dieser Stämme verteilte sich auf das untersuchte Ausgangsmaterial ziemlich gleichmäßig: 9 Stämme rührten von Rindern her, und zwar 5 aus Nierenproben und 4 aus der Muskulatur; 16 Stämme kamen von Schweinen, davon 7 aus Nierenmaterial und 9 aus Muskelgewebe.

3.3.4.1. Differenzierung

Die morphologische und biochemische Differenzierung führte bei den Stämmen zu folgenden Ergebnissen:

a) Pseudomonas fluorescens (10 Stämme)

Gramfärbung	Gramnegative Stäbchen
Dextrose 22° C) 37° C)	+
Katalase	+
Oxydase	+

Fermentations-Oxydationstest nach HUGH und LEIFSON (F/O-Test):

Gelatineverflüssigung:	-	
Beweglichkeit:	+	
Wachstum auf Ammoniumcitrat-Agar (SIMMON'S Citrat Agar):	+	
Reduktion von Nitrat zu Nitrit:	+	
Urease bildung:	-	
Wachstum auf MC CONKEY-Agar:	+	(ohne Präzipitat-Bildung)
Wachstum in Fleischwasser-Bouillon		
1) bei 37° C:	+	
2) bei 43° C:	-	
3) bei 4° C:	+	(bei der Mehrzahl der Stämme deutlich, bei einigen nur schwach)

Bildung von im filtrierten UV-Licht bläulich-grünlich fluoreszierendem Farbstoff

b) Pseudomonas aeruginosa (4 Stämme)

Reaktionen wie bei Pseudomonas fluorescens

aber: 1) Wachstum bei 43° C

2) kein Wachstum bei 4° C (meistens)

3) Ureasebildung pos.

4) Gelatine-Verflüssigung pos.

c) Alcaligenes faecalis (9 Stämme)

Gramfärbung:	Gramnegative Stäbchen
Beweglichkeit:	+
Pigmentbildung:	-
Wachstum bei 42° C:	+
Wachstum auf MC CONKEY-Agar:	+
Wachstum auf KCN:	+

Keine Säurebildung aus Glukose im peptonhaltigen Medium

Indolbildung:	-
Gelatine-Verflüssigung:	-
Urease:	-
Katalase:	+
Oxydase:	+

d) Serratia marcescens (1 Stamm)

Gramfärbung:	Gramnegative Stäbchen
Beweglichkeit:	+
Wachstum auf KCN-Medium:	+
Pigmentbildung:	hellrotes bis rotes Pigment bei 22 - 30° C
Katalase:	+
Oxydase:	-
Fermentationstest:	rasche Glukosespaltung mit Gasbildung
Gluconat:	+
Malonat:	+
Indolbildung:	-
Gelatine-Verflüssigung:	+ (sehr rasch)
Ornithin-Decarboxylase:	+

e) Bacillus cereus (1 Stamm)

Gramfärbung:	Grampositive sporenbildende Stäbchen
Beweglichkeit:	+
Morphologie:	Sporen oval, subterminal, Bazillen sind nicht geschwollen
Wachstum bei 45° C:	+ und bei pH 5,7
bei 65° C:	-

Citratverwertung:	+
Säurebildung aus Glukose:	+ (bei anaerobem Wachstum)
VP-Test:	+
Stärke (Verflüssigung)	+
Nitrat-Reduktion:	+
Indolbildung:	-
Gelatine-Verflüssigung:	+
Casein-Abbau:	+
Katalase:	+
Oxydase:	meistens verschieden
Lysozymempfindlichkeit:	widerstandsfähig
Eigelbreaktion:	+

3.3.4.2. Testung der Hemmaktivität

Um eine Vorstellung von der Hemmaktivität der isolierten Stämme zu gewinnen, wurde nach der auf S. 55 beschriebenen Agar-Strich-Technik verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt. Dabei ergibt zunächst eine einfache Gegenüberstellung, daß wiederum die Hemmzonen-Durchmesser bei pH 6,0 größer waren als bei pH 8,0. Die art- und stammspezifischen Unterschiede waren bei den isolierten Pseudomonasarten wenig auffällig. Etwas schmaler erschienen die Hemmzonen bei dem Serratia- und dem Bacillus-Stamm. Demgegenüber waren die Hemmzonen bei den Alcaligenes-Stämmen deutlich breiter. Sieht man von diesen Stämmen einmal ab, so lagen die Hemmzonen-Durchmesser mit 2 Ausnahmen (pH 6,0) bei oder unter 2 mm. Derartige Aktivitäten würden nach der gegenwärtig geltenden Regelung nicht mehr als positiv zu bewerten sein.

Tabelle 6

Species	Hemmhofgröße in mm bei pH 6	bei pH 8
Pseudomonas fluorescens	3	2
" "	2	1
" "	3	2
" "	2	2
" "	2	1
" "	2	2
" "	1	1
" "	2	1
" "	1	1
" "	2	1
Pseudomonas aeruginosa	2	2
" "	2	1
" "	1	1
" "	2	1
Serratia marcescens	2	1
Bac. cereus	1	1
Alcaligenes faecalis	3	2
" "	2	2
" "	4	3
" "	3	2
" "	3	3
" "	4	3
" "	2	2
" "	3	2
" "	4	3

In einer weiteren Anordnung wurde geprüft, ob die Verwendung von Dialysemembranen ausreicht, um unspezifisch positive Reaktionen mit Sicherheit bei stark verkeimtem Material zu verhindern. Hierzu wurden die Gewebsproben herangezogen, aus denen die oben beschriebenen 25 Stämme mit Hemmwirkung gegen Bac. subtilis BGA herausgezüchtet worden waren. Die Prüfung der Dialysierbarkeit der gebildeten Hemmstoffe erfolgte in der auf S.56 beschriebenen einfachen Anordnung.

Dabei zeigte sich, daß auch bei Anwendung der Dialysenmembran immer noch 16 von den 25 Proben (falsch) positiv reagierten. Es handelte sich um 5 Nieren- und 4 Muskelproben vom Rind sowie 4 Nieren- und 3 Muskelproben vom Schwein.

Die untersuchten 25 Stämme hatten in jedem Fall auch bei Auflegen einer Dialysemembran auf die Testplatten noch Hemmwirkung erkennen lassen. Es ist also allem Anschein nach auf die Anwesenheit dieser Organismen zurückzuführen, wenn die fraglichen 16 Proben trotz Dialysemembran noch immer ein unspezifisch positives Resultat erbrachten.

4. Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungen haben zunächst gezeigt, daß in der Zeit vom Januar bis September 1973 von 1.200 geschlachteten Tieren nur 16 Schweine (= 1,68 %) und nur ein Rind (= 0,4 %) im Hemmstofftest positiv reagierten. Gegenüber den früher aus der Bundesrepublik und auch aus West-Berlin bekannt gewordenen Werten müssen die vorliegenden Zahlen als extrem niedrig angesehen werden. Sie spiegeln allerdings die seit einigen Jahren deutliche Tendenz einer Verminderung positiver Hemmstoffergebnisse wider. Der Hemmstoffgehalt wurde bei einem Teil der Proben mittels Hochspannungselektrophorese bestätigt. Es fanden sich Substanzen, die in den Laufstrecken der Standardverdünnungen dem Streptomycin entsprachen. Bei den übrigen 9 hemmstoffpositiven Proben waren diese Untersuchungen negativ. Dabei handelte es sich um solche Proben, die Hemmhöfe von 3 mm oder weniger gezeigt hatten. Ausdrücklich muß bemerkt werden, daß nach dem damals gültigen Beurteilungsschema Hemmzonen über 1 mm als positiv bewertet worden sind.

Bei der Untersuchung von Schweinenieren im Doppelansatz auf Nährböden mit pH 6,0 und 8,0 wurden im sauren Milieu mehr positive Reagenten als im alkalisierten Nährboden erfaßt. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Feststellungen anderer Untersucher (TERPLAN et al., 1974), wonach "gehäuft positive Befunde speziell bei Schweinenieren und bei Verwendung des auf pH 8 eingestellten Mediums auftreten". UGUR (1975) konnte nachweisen, daß die pH-Abhängigkeit des Hemmhofdurchmessers bei den einzelnen Antibiotika variiert. Während die meisten der von ihm getesteten Stoffe bei pH 6 die größeren Hemmhofdurchmesser zeigten, traf dies gerade für Streptomycin nicht zu, was mit dem Ergebnis der hier durchgeführten hochspannungselektrophoretischen Identifizierung in

Widerspruch steht.

Bei den vorliegenden Untersuchungen war jedenfalls die Ausbeute positiver Reaktionen bei pH 6,0 höher. Dies betraf übrigens nicht nur die tatsächlich hemmstoffpositiven Fälle, sondern auch die Hemmzonendurchmesser bei den isolierten Inhibitor-Stämmen. Ob die stärker positiven Reaktionen bei pH 6,0 mit einer von NOUWS (1974) mitgeteilten Beobachtung zusammenhängt, müßte wohl noch nachgeprüft werden. Danach soll der Zusatz von 0,2% KH_2PO_4 zum Nährboden, wie er auch hier vorgenommen worden war, einen höheren Prozentsatz positiver Befunde ergeben. Fraglich ist auch, ob sich diese Unterschiede nur auf Proben vom Schwein beziehen. Eine Aussage über die Verhältnisse bei Proben vom Rind ist wegen des nur vereinzelten positiven Falles nicht möglich.

Entsprechend den Untersuchungsanweisungen gemäß Anlage 4 zu den AB.A in der Fassung vom 18.12.1973 soll erst "eine vollständige Wachstumshemmung mit einer auf der Nährbodenoberfläche durchgehenden Hemmzone von mindestens 2 mm" als positiv bewertet werden. Damit ist sichergestellt, daß der Anteil fälschlich positiv beurteilter Proben erheblich vermindert wird. Den Vorschlägen von ROTH (1971) und RIEVE et al. (1974) ist damit wenigstens zum Teil entsprochen.

Auf einen weiteren Gesichtspunkt haben FORSCHNER und GLENDE (1976) hingewiesen: Unspezifische Reaktionen könnten praktisch völlig vermieden werden, wenn die Gewebe vor dem Test nicht gefroren werden. Durch das Gefrieren würden Enzyme oder andere Stoffe frei, die eine unspezifische Hemmwirkung entfalten. Die Vermutung, daß es sich

hierbei um ein Lysozym oder ein ähnlich wirkendes Prinzip handeln könne, fand kürzlich durch experimentelle Untersuchungen von HEINERT et al. (1976) eine Bestätigung. Lysozym ist bei Verwendung eines entsprechenden Membranmaterials nicht dialysabel, und deshalb lassen sich die durch gewebseigene Enzyme verursachten unspezifischen inhibitorischen Effekte nach dem Vorschlag von FORSCHNER und GLENDE (1976) ausschalten.

Nicht beherrschen lassen sich mit der Dialysemembran-Methode indessen die von mikrobieller Besiedelung herrührenden Aktivitäten, worauf übrigens auch FORSCHNER und GLENDE (1976) hinweisen. Wie die auf S. 70 dargestellten Ergebnisse zeigen, können aus stark verkeimtem Material Stoffe durch Membranen hindurch in den Test-Agar diffundieren und dort eine deutliche Hemmwirkung gegenüber Bac. subtilis BGA entfalten. Ob der beschriebene Effekt tatsächlich auf mikrobielle Stoffwechselprodukte der Verderbsflora zurückgeführt werden muß, ist zwar nicht mit Sicherheit bewiesen, jedoch auf Grund der vorangegangenen Versuche mit dem eindeutigen Nachweis entsprechend hemmaktiver Bakterienstämme in dem fraglichen Material sehr wahrscheinlich.

Unspezifische Hemmaktivitäten als Folge bakterieller Verkeimung ließen sich bei 63 (= 2,7 %) von insgesamt 2.370 Gewebsproben durch Lagerung bis zum völligen Verderb provozieren. Die Untersuchungen nach dem hierfür entwickelten Schema sicherten die Möglichkeit, die "positiven" Ergebnisse wenigstens zum Teil zu reproduzieren. Die mehrfach wiederholte Prüfung ein und desselben Materials im Hemmstofftest er-

möglichte einen Überblick darüber, ob in der Hemmwirkung von Mischpopulationen bzw. deren Stoffwechselprodukten während der Aufbewahrung der Proben quantitative Änderungen eintreten.

Durch zum Teil recht aufwendige Techniken gelang es schließlich, aus dem verkeimten Material verschiedene Mikroorganismen zu isolieren, die als Pseudomonas (Ps. fluorescens, Ps. aeruginosa), Bacillus cereus, Alcaligenes faecalis und Serratia bestimmt werden konnten. Offenbar spielen in diesem Untersuchungsmaterial psychrophile bzw. psychrotolerante Keime eine große Rolle. Escherichia coli und Proteusstämme, die besonders von FORSCHNER (1973) und HEINERT et al. (1976) als die häufigsten Kontaminationskeime betrachtet werden, sind zwar in diesem Material ebenfalls gefunden worden, aber als Ursache einer Antibiose gegen Bac. subtilis konnten sie in unserer Versuchsanordnung nicht nachgewiesen werden. Besonders auffällig ist, daß die Proteusstämme, die doch vielfältigen Literaturangaben zufolge überaus häufig für unspezifische Hemmwirkungen verantwortlich sein sollen, in dem vorliegenden Material in keinem Fall eine solche Aktivität zeigten. Auffällig ist in den hier beschriebenen Versuchen weiterhin, daß die 25 Stämme mit nachweislich reproduzierbarer inhibitorischer Aktivität sich auf lediglich 5 verschiedene Species verteilten. Möglicherweise hängt das damit zusammen, daß sämtliche Proben, die hier verarbeitet worden sind, von der gleichen Schlachtstätte herrührten. Die Vermutung liegt nahe, daß alle Proben mit derselben Flora - gewissermaßen der "Hausflora" - kontaminiert worden sind, was das mehrfach wiederholte Auftreten des gleichen Stammes leicht erklären würde.

In Anlage 4 zu § 20 (4) AB.A in der Fassung vom 18.12.1973 wird festgestellt: "Stark keimhaltiges Untersuchungsmaterial ist für die Untersuchung auf Hemmstoffe ungeeignet". Leider findet sich in der entsprechenden Vorschrift kein Hinweis darauf, wie die starke Verkeimung des Untersuchungsmateriales vor der kulturellen Untersuchung zu erkennen ist. Erst nach der vorgesehenen Bebrütung ist an der Ausbildung des Koloniesaumes um die Gewebsprobe herum bei einiger Erfahrung der ungefähre Kontaminationsgrad des Ausgangsmateriales abzuschätzen. Wenn eine solche Schätzung nicht möglich ist und zudem die Hemmhöfe einen Durchmesser von 2 mm deutlich überschreiten, müßte eine klar "positive" Beurteilung erfolgen. Zumindest durch das Experiment ist nachgewiesen, daß die Anwesenheit mikrobieller Metaboliten der Kontaminationsflora zu solchen Fehlinterpretationen führen kann.

Es würde sich anbieten, derartige Fälle, in denen pseudo-positive Reaktionen vermutet werden, durch bakteriologische Folgeuntersuchungen abzuklären. Die vorliegenden Untersuchungen haben aber gezeigt, wie schwierig die Identifizierung solcher Reaktionen ist. Trotz Einsatzes aufwendiger Methoden ist es nur in 25 von insgesamt 63 Fällen pseudo-positiver Hemmwirkungen gelungen, die Ergebnisse zu wiederholen und die Antibiose mit Reinkulturen zu reproduzieren. Die übrigen 38 Fälle konnten nicht geklärt werden. Man könnte annehmen, daß die individuelle mikrobiologische Gesamtsituation des Ausgangsmateriales mit den antagonistischen und synergistischen Effekten einer sich in ihrer Zusammensetzung ständig ändernden Flora

für die Hemmwirkung verantwortlich war und nicht nur ein einzelner Stamm. Bei einer Erfolgsrate von weniger als 40 % unter Einsatz aller zur Verfügung stehenden Methoden kann man den Versuch einer routinemäßigen bakteriologischen Abklärung derartiger pseudo-positiver Reaktionen nicht erwägen, und zwar umso weniger, als bei der amtlichen bakteriologischen Fleischuntersuchung auch eine erhebliche zeitliche Beschränkung zu berücksichtigen ist. Als wesentlichste Schlußfolgerung, die bei künftiger Novellierung der geltenden legislativen Regelung berücksichtigt werden sollte, ergibt sich die Forderung nach steriler Probenahme, der Kühlung (nicht Gefrieren! vgl. FORSCHNER und GLENDE, 1976 sowie HEINERT et al., 1976) des Materials und eine Begrenzung der Frist bis zum Anlegen des Tests auf 24 Stunden.

Die Untersuchungsergebnisse lassen demgemäß folgende Hinweise für die Praxis zu:

a) Für die Durchführung des mikrobiologischen Hemmstofftestes ist die Entnahme und Qualität der Proben entscheidend. Bei der Entnahme der Proben sollte man größtmögliche Sauberkeit walten lassen. Die erstrebenswerte "sterile" Entnahme der Proben ist ohne geeignetes Werkzeug nicht zu realisieren. Die häufig geübte Praxis der Entnahme von Muskelteilen ohne schützende Fascie ist abzulehnen, wie es LEVETZOW und WEISE (1974) für die Zwerchfellmuskulatur getan haben. Nur die Einsendung eines von Fascien umschlossenen Muskelbauches bietet einige Gewähr, daß bakterielle Kontaminationen vermieden werden können. Die Entnahme so großer Fleischstücke, die ein Vielhundertfaches der für den Test tat-

sächlich benötigten Menge ausmachen, ist jedoch wirtschaftlich nicht vertretbar, sofern geeignetere Methoden angeboten werden. So empfiehlt sich die von REUTER und MARX (1974, 1976) vorgeschlagene einfache Vorrichtung zur Entnahme von Gewebsproben für die amtliche bakteriologische Fleischuntersuchung auch zur Gewinnung sterilen Materials für den Hemmstofftest.

b) Für den Versand der Proben ist durch den Arbeitskreis lebensmittelhygienischer tierärztlicher Sachverständiger (ALTS) eine ausreichende Kühlung und zweckmäßige Verpackung vorgeschlagen worden. Es muß aber in jedem Falle darauf geachtet werden, daß die Proben nicht später als 24 Stunden nach der Schlachtung untersucht werden; denn vor allem bei Lagerung bei 5^{0} C ließen sich nach Ablauf dieser Frist schon die ersten pseudo-positiven durch Kontaminationskeime verursachten Hemmzonen beobachten. Da der Versand der Proben nicht immer befriedigend zu lösen ist, sollte die Dezentralisierung dieser Untersuchung im Sinne von FORSCHNER (1973) angestrebt werden.

c) Schließlich ist für die weitere Bearbeitung der Proben an den Untersuchungsstellen die Forderung nach der Wahrung größtmöglicher Sorgfalt im Hinblick auf weitgehend keimfreie Handhabung zu richten. Daß dem eine sterile Entnahme des Materials aus der Tiefe der Proben voranzugehen hat, wurde als selbstverständliche Voraussetzung bereits erwähnt.

d) Für die Auswertung des Ergebnisses gewinnt ein Hinweis von FORSCHNER (1973) an Gewicht: Er empfiehlt, die fleischbeschaurechtliche Beur-

teilung nicht von der schematischen Ausmessung der Hemmhofgröße abhängig zu machen, sondern das gesamte mikrobiologische Geschehen zu berücksichtigen, insbesondere die Möglichkeit anderer Beeinträchtigungen des Testkeims zu erwägen.

Der Untersucher wird deshalb bei der Interpretation von Ergebnissen des Hemmstofftestes nach wie vor alle Einzelumstände unter Berücksichtigung des aktuellen Standes der wissenschaftlichen Erkenntnis kritisch abzuwägen haben. Insbesondere wird er aber auch umfangreicher eigener Erfahrung bedürfen, um falsch positive Resultate zuverlässig abgrenzen zu können.

5. Zusammenfassung

a) Untersuchungen von 1.200 Schlachttieren von Januar bis September 1973 am Schlachthof Berlin-Spandau führten bei 16 Schweinen und einem Rind zu einem positiven Hemmstofftest (HT).

b) Im mikrobiologisch-chemischen Test (MC-Test) konnte bei 8 der 17 positven Proben eine Streptomycin-ähnliche Substanz als hemmender Rückstand ermittelt werden. Proben mit Hemmhöfen unter 3 mm konnten durch diese Untersuchungsmethode nicht weiter abgeklärt werden.

c) In hemmstoff-negativen Proben kam es nach provozierter Verkeimung zur Ausbildung von hemmenden Aktivitäten. Diese gegen den Testkeim Bac. subtilis BGA wirksame Antibiose war in 63 Fällen nachweisbar, konnte aber nur in 25 Fällen mit isolierten Reinkulturen reproduziert werden.

d) Für die Praxis der mikrobiologischen Hemmstoffuntersuchung ist die Abklärung pseudo-positiver Reaktionen durch bakteriologische Folgeuntersuchungen wegen der niedrigen Erfolgsrate zu aufwendig.

e) Das Problem sekundärer Kontamination des Untersuchungsmaterials ist nur durch Wahrung größter Sorgfalt, insbesondere bei der Entnahme der für den Hemmstofftest vorgesehenen Proben, zu beeinflussen.

f) Von großer praktischer Bedeutung ist es, daß das Untersuchungsmaterial steril aus der Tiefe der betreffenden Tierkörper-Teilstücke entnommen wird, und daß die Zeitspanne zwischen der Entnahme und der Untersuchung der für den HT vorgesehenen Proben 24 Stunden nicht überschreitet.

5. Summary

a) Examinations of 1,200 slaughtered animals at the slaughter house at Berlin-Spandau between January and September 1973 with a so called "H-test" lead to the result of 1.68 per cent inhibitor-positive pigs and 0.4 per cent cattle. In comparison with previous findings these numbers seem to be extremely low.

b) Within a microbiological-chemical test (MC-test) in about 50 per cent of swine, streptomycin like substances occurred as an inhibiting residue. Tests with inhibiting zones smaller than 3 mm could not be clarified by this method of examination.

c) After provoked germination with inhibitor negative samples inhibiting activities were cultivated. This antibiosis, effective against test organism Bac. subtilis BGA, was indicated in 63 cases, but only in 25 cases it could be reproduced with isolated pure cultures and be referred to those.

d) Because of the small rate of success, the bacteriological clarification of pseudopositive reactions is too expensive in the practice of microbiological inhibitor analysis.

e) The problem of secondary contamination of the tissue samples may only controlled by maintaining the highest carefulness during sampling and dispatch of the test specimens.

f) It is very important, that the material be taken from the depth of the resp. parts of the carcass and that the time between sampling and examination of the tissue samples taken be no longer than 24 hours.

6. Literatur

Abbott, J.D. u. Shannon, R.: A method for typing Shigella sonnei using colicine production as a marker. J. clin. Path. 11, 71-77 (1958)

Alfort, J.A. u. Palumbo, S.A.: Interaction of salt, pH and temperature on the growth and survival of salmonellae in ground pork. Appl. Microbiol. 17, 528-532 (1969)

Ashton, D.H. u. Busta, F.F.: Milk components inhibitory to Bacillus stearothermophilus. J. Dairy Sci. 51, 842-847 (1968)

Avery-Dubos (Zit. nach Etinger-Tulczynska, 1932) J. exper. Med. 54, 51 (1931)

Ayres, J.C.: Low temperature organisms as indexes of quality of fresh meat. in: "Microbiological Quality of Foods". Edit.: Slanetz - Chichester - Gaufin - Ordal Verlag Acad. Press, New York - London (1963)

Babes, V.: (Zit. nach Jennings u. Sharr, 1974) J. Corn. Med. Prat. Paris 7, 321 (1885)

Bader, R.E. u. Hotz, G.: Eisen-Harnstoff-Agar, eine Modifikation des Eisen-Agars nach Kligler. Z. Hyg. 133, 20 (1951)

Bail, O.: Ergebnisse experimenteller Populationsforschung. Z. Immunitätsforschung 60, 1-22 (1929)

Baird - Parker, A.C.:	Methods for Classifying Staphylococci and Micrococci. in: Gibbs, B.M. a. Skinner, F.A.: Identification Methods for Microbiologists. Acad. Press, London - New York (1966)
Baird-Parker, A.C. u. Framer, B.:	Combined effect of water activity, pH and temperature on the growth of Cl. botulinum and vegetative cell inocula. J. Appl. Bact. 30, 420-429 (1967)
Baribo, L.E. u. Foster, E.M.:	The production of a growth inhibitor by lactic streptococci. J. Dairy Sci. 34, 1136-1144 (1951)
Barrow, G.I.:	Microbial antagonisms by Staphylococcus aureus. J. gen. Microbiol. 31, 471 (1963)
Bartels, H., Angersbach, H. u. Klare, H.J.:	Nachweis von Hemmstoffen bei Tieren aus Normalschlachtungen. Fleischwirtschaft 52, 479-482 (1972)
Bartholomew, J.W., u. Mittwer, T.:	(Zit. nach Kundrat, 1963) Stain Technol. 25, 153 (1950)
Bergey	Manual of Determinative Bacteriology. 8th edition Williams u. Wilkins Comp., Baltimore (1974)
Bisping, W.:	Die Kehrseite der Antibiotikatherapie aus der Sicht der Veterinärmedizin. Dtsch. tierärztl. Wochenschrift 18, 495-498 (1962)

Blackford, V.L.: antibiotic activity of selected enteric organisms. Antibiotics and Chemotherapy 1, 392-398 (1951)

Bloom, W.L. u. Blake, F.G.: Studies on an antibacterial polypeptide extracted from normal tissues. J. Infect. Dis. Chicago 83, 116-123 (1948)

Bloom, W.L. u. Prigmore: A Method for preparation of antibacterial basic proteins of normal tissues. J. Bact. Baltimore 64, 855-858 (1952)

Bonfert, W. u. Berrang, K.: Hemmstoffnachweis im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung Arch. Lebensmittelhyg. 20, 61-63 (1969)

Bowling, R.E. u. Wynne, E.S.: Studies on the mechanism of antagonism by Aerobacter strains. Rev. Immunol. 2, 323 (1947)

Brandis, H. u. Branda, J.: Bacteriocine und bacteriocinähnliche Substanzen. VEB Gustav Fischer Verlag, Leipzig (1971)

Briggs, C.A.E., Willingsdale, J.M., Braude, R. u. Mitchell, K.G.: The normal intestinal flora of the pig I. Bacteriological methods and qualitative studies. Vet. Rec. 66, 241 (1954)

Brüggemann, J.: Über die Anwendung der Antibiotika in der Tierernährung. Dtsch. tierärztl. Wochenschrift 62, 14-16 (1955)

Brunn, H.J.: Untersuchungen über die Anwendung einiger Nachweismethoden zur Feststellung von Antibiotika in Milch. Vet. med. Diss. Gießen (1971)

Buchner, H.: Über die nähere Natur der bakterientötenden Substanz im Blutserum. Central. Bakt. Parasitenk. 6, 561-565 (1889)

Buchner, H.: Neue Fortschritte in der Immunitätsfrage. Münch. med. Wschr. 41, 497-500 (1894)

Bulling, E., Scholz, M., u. Malla, D.S.: Antibiotika-Resistenz von Enterobakterien aus Tiermaterial und Versuche zur Übertragung der Mehrfachresistenz in vitro. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 81, 151-153 (1968)

Burger, W.C. u. Stahlmann, M.A.: The agglutination and growth inhibition of bacteria by lysine polypeptides. Arch. Biochem. Biophys. 39, 27-36 (1952)

Bürgers (Zit. nach Etinger - Tulczynska, 1932) Klin. Wschr. S. 1666 (1930)

Buttiaux, R. u. Mossel, D.A.A.: The significance of various organisms of fecal origin in food and drinking water. J. Appl. Bact. 24, 353-364 (1961)

Carpenter, K.P., Lapage, S.P. u. Steel, K.J.: in Gibbs, B.M. and Skinner, F.A.: Identification methods for microbiologists. Acad. Press, London - New York (1966)

Catron, D.V.: Antibiotika in der Tierernährung. Münchener Symposium (1954)

Cavett, J.J.: The microbiology of vacuum packed sliced bacon. J. Appl. Bact. 25, 282-289 (1962)

Christensen, W.B.: Urea decompositions means of differentiating Proteus and Paracolon cultures from each other and from Salmonella and Shigella types. J. Bact. 52, 461-466 (1946) (Zit. nach Müller, 1969)

Clarenburg, A. u. Kampelmacher, E.H.: Die Bedeutung von Antibiotika für die bakteriologische Fleischbeschau mit besonderer Berücksichtigung der Milzbrand- und Salmonella-Diagnostik. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 70, 203-205 (1957)

Conn, H.J. u. Bright: (Zit. nach Lewis, 1929) J. Agric. Res. 16, 315-350 (1919)

Coretti, K.: Mikrobiologischer Nachweis von Hemmstoffen in Gelatine. Fleischwirtschaft 11, 737-739 (1959)

Cowan, S.T. u. Steel, K.J.: Manual for the identification of medical bacteria. 2nd. Edition Cambridge University Press (1974)

Dozier, C.C.: Optimum and limiting hydrogen ion concentration for B. botulinus and quantitative estimation of ist growth. J. Infect. Dis. 35, 105-133 (1924)

Dujardin, u. Beaumetz, E.: Action antibiotique dûne variété de staohylocoque à l'égard des BAcilles grampositifs et acido-reśistants. C.R. Soc. Biol. 110, 1210-1213 (1932)

Duliscouet, R.: Action probiotique et antibiotique des staphylocoques chez les porteurs de germes diphtériques. C.R. Soc. Biol. 118, 1277 (1935)

Eddy, B.P. u. Ingram, M.: The occurrence and growth of staphylococci on packed bacon, with special reference to Staphylococcus aureus. J. Appl. Bact. 25, 237-247 (1962)

Elmossalami, E.: Nimmt der Oberflächenkeimgehalt von Schlachtrindern im Kühlraum zu? Vet. med. Diss., Berlin-West (1957)

Emmerich, R. u. di Mattei: (Zit. nach Etinger - Tulczynska, 1932) Fortschr. Med. (1887)

Emmerich, R. u. Loew, O.: Bakteriologische Enzyme als Ursache der erworbenen Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten durch dieselben. Z. Hyg. 31, 1-65 (1899)

Etinger u. Tulczynska, R.: Über Bakterienantagonismus. Z. Hyg. Inf. 113, 762-780 (1932)

Ferrando, R.: Hormones, antihormones et antibiotiques dans l'alimentation des volailles. Ann. nutr. aliment. 8, 459 (1954)

Fewins, B.G., Newland, L.G.M. u. Briggs, C.A.E.: The normal intestinal flora of the pig. III. Qualitative studies of the lactobacilli and streptocicci. J. Appl. Bact. 20, 234-242 (1957)

Fleming, A.: A remarkable bacteriolytic element found in tissues and excretions. Prov. Roy. soc. (London) 39, 306-310 (1922)

Foltin, H.: Zur Frage des Salmonellennachweises bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung nach Antibiotika-Beifütterung bzw. -Therapie. Vet. med. Diss. München (1960)

Forck, G.: Häufigkeit und Bedeutung von Chloramphenicol-Allergien. Dtsch. med. Wschr. 96, 161-165 (1971)

Forschner, E.: Hemmstoffe in Organen von Schlachttieren. Arch. Lebensmittelhyg. 13, 242-246 (1962)

Forschner, E.: Bisherige Erfahrungen mit dem allgemeinen Hemmstofftest. Referat Arbeitstagung ALTS 15. - 17.11.1973 in Berlin

Forschner, E. u. Glende, W.: Die Schweineniere als Problemorgan beim biologischen Hemmstofftest. Fleischwirtschaft 56, 226-228 (1976)

Frank, H.: Antibiotikakontrolle und Möglichkeiten zur Vermeidung von Schäden im Betrieb. Molk.- u. Käse-Ztg. 14, 1453 (1963)

Fredericq P.: Sur la destruction des colicines par les protéases microbiennes. C.R. Soc. Biol. 142, 403 (1948)

Freter, R.: In vivo and vitro antagonism of intestinal bacteria. II. The inhibitory mechanism. J. Infect. Dis. 110, 38-46 (1962)

Forst, W.D.: (Zit. nach Lewis, 1929) J. Infect. Dis. 1, 599-640 (1904)

Gagliano, V.J. u. Hinsdill, R.D.: Characterization of a Staphylococcus aureus bacteriocine. J. Bact. 104, 117-125 (1970)

Gal, J.E.: Über die antibakterielle Wirksamkeit von Gewürzpaprika. Aktivitätsprüfung von Capsicidin und Capsaicin. Z. Lebensmittelunters. - forsch. 138, 86-92 (1968)

Gal, J.E. u. Vajda, Ö.: Die Rolle der Phytozide in der Haltbarmachung von Lebensmitteln. Nahrung 12, 623-630 (1968)

Gardner, J.F.: An antibiotic produced by Staph. aureus. Brit. J. Exp. Path. 30, 130-138 (1949)

Garre, C.: Über Antagonisten unter den Bakterien. Zbl. Bakt. 2, 312-313 (1887)

Gartside, R.N.: The detection of antibiotica in canned meats (1960) (Zit. nach F.K. Käferstein, 1964)

Gemmer, H.: Erste Erfahrungen mit dem in der AB.A zum Fleischbeschaugesetz vorgeschriebenen Untersuchungsverfahren zur Rückstandsanalytik. Arch. Lebensmittelhyg. 26, 52-58 (1975)

Gemmer, H. u. Seeger, H.: Der Nachweis von Hemmstoffen in der bakteriologischen Fleischuntersuchung und seine Bedeutung für den Verbraucher. Dtsch. tierärztl. Wschr. 77, 577-600 (1970)

Gerlach, H.: Zur Resistenztestung gegen Antibiotika und Sulfonamide. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 80, 231-234 (1967)

Gisske, W., Wenzel, S., Pichnarcik, J., Schaper, J. u. Ennen, E.: Allgemeiner Hemmstoffnachweis bei normalgeschlachteten tauglich beurteilten Kälbern, Schweinen und Rindern. Arch. Lebensmittelhyg. 21, 25-30 (1970)

Gratia, A.: Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de Colibacilles. C.R. Soc. Biol. 93, 1040-1043 (1925)

ders.: Techniques sélectives pour la recherche systematique des germes antibiotiques. C.R. Soc. Biol. 140, 1053-1055 (1946)

Gratia, A. u. Frederiq, P.: Diversité des souches antibiotiques de B. coli et étendue variable de leur champs d'action. C.R. Soc. Biol. 140, 1032 (1946)

Graves, R.R. u. Frazier, W.C.: Food microorganisms influencing the growth of Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol. 11, 513-516 (1963)

Groth, W.: Histologisch-physikalische Untersuchungen an endikrinen Drüsen und am Magen-Darm-Kanal im Hinblick auf den Wirkungsmechanismus der Antibiotikafütterung beim Tier. Arch. exper. Vet. med. 15, 30-73 (1960)

Gundel, M. u. Nimstedt: (Zit. nach Etinger - Tulczynska, 1932) Münch. Med. Wschr. S. 1674 (1925)

Gundel, M. u. Kliewe, H.: Experimentelle Untersuchungen über das antagonistisch wirksame Prinzip der Coli- gegenüber Milzbrandbazillen. Zbl. Bakt. I. Orig. 124, 519-528 (1932)

Halbeisen, Th.: Untersuchungen des antagonistischen Wirkstoffes einer höheren Pflanze (Tropaeolum majus - Kapuzinerkresse). Medizinische 36, 1212-1294 (1954)

Harrigan, W.F. u. Mc Cance, M.E.: Laboratory methods in microbiology. Acad. Press London - New York (1966)

Heimbücher, K.E.: Möglichkeiten und Grenzen des BGA-Hemmstofftestes. Vet. med. Diss. München (1975)

Heinert, H.H., van der Wall, G. u. Brehmer, H.: Lysozym - Ursache von unspezifischen Reaktionen im mikrobiologischen Hemmstofftest. Arch. Lebensmittelhyg. 27, 55-60 (1976)

Hentges, D.J. u. Freter, R.: In vivo and in vitro antagonism of intestinal bacteria against Shigella flexneri. I. Correlation between various tests. J. Infect. Dis. 110, 30-37 (1962)

Hess, E.: Die Bedeutung der Fleischhygiene. Alimenta Sonderheft 1970, 35-38

Hirsch, A.: Growth and nisin production of a strain of Streptococcus lactis. J. gen. Microbiol. 5, 208-221 (1951)

Kirsch, J.G.: Studies of the bactericidal action of phagozytin. J. Exper. Med. 103, 613-621 (1956)

Hoyle, M. u. Nichols, A.A.: Inhibitory strains of lactic streptococci and their significance in the selection of cultures for starter. J. Dairy Res. 15, 398-408 (1948)

Hörter, R. u. Klein, H.: Zur Vereinfachung der Arbeitsmethoden und der Befundmitteilung bei dem Hemmstofftest. Arch. Lebensmittelhyg. 25, 199-200 (1974)

Hsu, Ch. u. Wiseman, G.M.: Antibacterial substances from staphylococci. Can. J. Microbiol. 13, 947-955 (1967)

Hugh, R. u. Leifson, R.: A description of the type strain of Pseudomonas maltophila-
Int. Bull. Bact. Nomencl. Taxon. 13, 133 (1963)

Illes, M. u. Szent-Ivanyi, M.: Antibiotic content of eggs laid by hens fed Erra continously.
Acta. vet. Acad. Sc. Hung. 19, 47-51 (1969)

Inal, T.: Vergleichende Untersuchungen über die Selektivmedien zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Bacillus cereus in Lebensmitteln.
Fleischwirtschaft 3, 347-349 (1972)

Ingram, M.: Factors controlling the occurrence of varous bacteria in semipreserved meats.
Ann. Inst. Pasteur Lille 7, 136-145 (1955)

Ingram, M. u. Dainty, R.H.: Changes caused by microbes in spoilage of meats.
J. Appl. Bact. 34, 21-39 (1971)

Jacob, F., Siminovitch, L. u. Wollman, E.L.: Comparaison entre la biosynthèse induite de la colicine et des bactériophages et entre leur mode d'action.
Ann. Inst. Pasteur 84, 313 (1953)

Jennings, M.A. u. Sharp, A.E.: Antibacterial activity of the staphylococcus.
Nature 159, 133-134 (1947)

Jepsen, A.: Application of bacteriological and biochemical tests in the hygienic judgement of meat and meat products. Meat Hygiene WHO Monograph Series Nr. 33, Rom (1957)

Kafel, S. u. Majewska, D.: Comparative studies on the effect of incubation (the incubation test) and storage of psteurized hams on the bacteriological condition ot these products. Bull. Inst. west. Pulaw. 5, 6 (1961)

Kafel, S. u. Ayres, J.C.: The antagonism of enterococci on other bacteria in canned hams. J. Appl. Bact. 32, 217-232 (1969)

Käferstein, F.K.: Nachweis und Bedeutung des Vorkommens von Antibiotika im Fleisch von Schlachtschweinen. Vet. med. Diss., Gießen (1964)

Kalich, J. u. Merkenschlager, M.: Zur Frage des Salmonellennachweises in Organen nach Antibiotika-Therapie bzw. -Beifütterung. Tierärztl. Umschau 13, 324-328 (1958)

Kammerer, H.: Das Verhalten von Bakterien gegen einige Blutfarbstoffderivate. Verhandl. dtsch. Kongr. Med. 31, 704-715 (1914)

Kante, H.: Untersuchungen über die Bedeutung von Brühhilfsmitteln bei Schweineschlachtungen. Vet. med. Diss., Berlin-West (1963)

Kao, C.T. u. Frazier, W.C.: Effect of lactic acid bacteria on growth of Stpahylococcus aureus. Appl. Microbiol. 14, 251-255 (1966)

Katchalski, E., Bichowski, L., Slomnitzki, L. u. Volcani, B.E.: Action of some water-soluble polyamino-acids on bacteria. Nature 196, 1095-1096 (1952)

Kelch, F.: Bakteriologische Untersuchungen in Betrieben, die der Lebensmittelgewinnung und -herstellung dienen. Habil. Schrift Berlin (1953)

Kenner, B.A., Clark, H.F. u. Kabler, P.E.: Fecal Streptococci in surface waters. Appl. Microbiol. 9, 15 (1961) (Zit. nach Schmidt-Lorenz, 1965)

van Keulen, A.: Public health aspects of residues of antibiotics and some hormones in food of animal origin. Proc. 4th Symp. W.A.V.F.H. Lincoln, 372 (1965)

Kewitz, H.: Antibiotika in der Tierernährung. Zbl. Vet. Med. B 17, 116-120 (1970)

Klein, D.: Der Hemmstoff- und Hormonnachweis bei Schlachttieren. Tierärztl. Umschau 27, 25-26 (1972)

Klein, D. u. Ditgens, K.: Zur Beurteilung des unspezifischen Keimgehaltes der Muskelproben bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Tierärztl. Umschau 21, 505-514 (1966)

Klima, H.: Zur Frage des Hemmstoffnachweises anläßlich der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Fleischwirtschaft 46, 1347-1349 (1966)

Knothe, H.: Antibiotische Stoffe in der Tierhaltung und mögliche Rückwirkungen auf den Menschen im Hinblick auf Allergien und Resistenz. Dtsch. Tierärztebl. 15, Sonderteil, 26-29 (1967)

Kotter, L., Terplan, G. u. Schulz, H.: Biologischer Nachweis von Hemmstoffen in Lebensmitteln tierischer Herkunft. Arch. Lebensmittelhyg. 10, 145-152 (1959)

Kotter, L.: Einschaltung eines biologischen Hemmstofftestes bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Fleischwirtschaft 12, 188-189 (1960)

Kraatz, J. u. Tolle, A.: Zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch mit dem Brillantschwarz-Reduktionstest. Arch. Lebensmittelhyg. 20, 145-155 (1969)

Kraus, H.: Über die Bakterienflora in fleischverarbeitenden Betrieben und ihre Bedeutung für die Entstehung von Fehlfabrikaten besonders in der warmen Jahreszeit. Arch. Lebensmittelhyg. 11, 157-160 (1960)

Kundrat, W.: Methoden zur Bestimmung von Antibiotika-Rückständen in tierischen Produkten. Z. Anal. Chemie 243, 624-630 (1968)

Kundrat, W.: Vergleichende Versuche und Gedanken zur Durchführung von Hemmstofftesten. Fleischwirtschaft 53, 1121-1125 (1973)

Kundrat, W.: Zur Differenzierung aerober Sporenbildner (Genus Bacillus Cohn) Zbl. Vet. Med. B 10, 418-426 (1963)

Lachowicz, T. u. Romanowski, T.: Untersuchungen über den Isoantagonismus von Staphylokokken - II. Bakteriologische Eigenschaften der Antagonisten-Stämme und ihre Empfindlichkeit gegen Staphylococci A. Med. Dośw. Mikrobiol. 14, 281-287 (1962)

Lachowicz, T. u. Romanowski, T.:	Empfindlichkeit gegen Staphylococcin A von aus Staphylokokkenträgern isolierten Staphylokokken. Med. Dósw. Mikrobiol. 14, 305-309 (1962)
Lachowicz, T., Romanowski, T. u. Walczynski, S.:	Bakteriologische Eigenschaften und Empfindlichkeit gegen Staphylococcin A von aus pathologischen Veränderungen der Haut isolierten Staphylokokken. Med. Dósw. Mikrobiol. 14, 297-304 (1962)
Lachowicz, T.:	Staphylococcin - an antibiotic substance of staphylococcal origin active against Staphylococcus and other gram-positive bacteria. Przeglad Lekarski 19 II, 448-449 (1963)
Ders.	Investigations on Staphylococcus. Zbl. Bakt. I.Orig. 196, 340-351 (1965)
Lachowicz, T. u. Walczak, Z.:	Preliminary report on purification of Staphylococcin. Postepy Mikrobiol.V, 213 (1966)
Dies.	Purification and properties of staphylococcin A. Arch. Immun. Therap. Exp. 16, 855 (1968)
Langner, H.J., Teufel, U., Siegert, M. u. Frommhold, M.:	Der chemische und mikrobielle Nachweis von Antibiotika. Fleischwirtschaft 53, 243-246, 249 (1973)

Lerche, M.: Hygiene der Fleischgewinnung, Fleischverarbeitung und Fleischabgabe.
Sonderdruck aus: Hyg. Probleme bei Gewinnung, Verarbeitung und Vertrieb von Lebensmitteln, Wissenschaftl. Veröffentlichung der Dtsch. Ges. für Ernährung, Band 7, 28-29 (1961)

Lewek, T.: Über den Wachstumseinfluß nichtpathogener Spaltpilze auf pathogene.
Zbl. Bakt. 7, 107 (1890)

Levetzow, R.: Untersuchungen auf Hemmstoffe im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung.
Bundesgesundheitsblatt 14, 211-213 (1971)

Ders. Vorkommen und Bedeutung von Enterokokken in Fleisch.
Arch. Lebensmittelhyg. 23, 240-242 (1972)

Ders. Korreferat auf der Arbeitstagung des ALTS vom 15. bis 17.11.1973 in Berlin

Levetzow, R. u. Weise, E.: Zur Rückstandsuntersuchung im Rahmen der amtlichen Fleischuntersuchung.
Schlacht- u. Viehhof-Ztg. 74, 329-336 (1974)

Lewis, I.M.: Bacterial antagonism with special reference to the effect of Ps. fluorescens on spore forming bacteria of soils.
J. Bact. 17, 89-103 (1929)

Limsong, S. u. Frazier, W.C.: Adaption of Ps. fluorescens to low levels of water activity produced by different solutes.
Appl. Microbiol. 14, 899-901 (1966)

Lorenzen, P.: Anwendung und Auswertung des Antibiotikatestes in der bakteriologischen Fleischuntersuchung.
Arch. Lebensmittelhyg. 18, 30-32 (1967)

Lochmann, E.H.: Über die Bedeutung der Laktobazillen für Fleisch- und Fischwaren und zum Einfluß der Temperatur auf das Verhalten verschiedener aus Fleisch- und Fischwaren isolierter Laktobazillenstämme.
Arch. Lebensmittelhyg. 12, 206-210 (1961)

Loeb, L.J., Moyer, A. u. Murray, R.G.E.: An antibiotic produced by Micrococcus epidermis.
Can. J. Res. 28 E, 212-216 (1950)

Ludwig, E.: Über das Vorkommen von psychrotoleranten Bakterien, insbesondere von Pseudomonasarten, auf der Oberfläche frisch geschlachteter Rinder.
Vet. med. Diss. Hannover (1964)

Mantel, Th.: Ergebnisse von Untersuchungen nach einer einheitlichen Untersuchungsmethode zum Nachweis von Hemmstoffen in Nieren bei Schlachttieren.
Vortrag, gehalten auf der 14. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutsche Veterinärmedizinischen Gesellschaft in Freiburg (1971)

Mac Conkey, A.T.: Bile salt media and their advantages in some bacteriological examinations.
J. Hyg., Camb. 8, 322 (1908)

Marten, G.: Die mikrobiologische Antibiotikabestimmung in Futtermitteln. II. Mitteilung Ldw. Forsch. 17, 277-281 (1964)

Marx, M.: Untersuchungen zur Mikrobiocoenose von Lebensmittelmikroorganismen. Vet. med. Diss. Berlin-West (1972)

Marx. M. u. Reuter, G.: Erhebungen über Häufigkeit und Bewertung des sogenannten unspezifischen Keimgehaltes bei der amtlichen bakteriologischen Fleischuntersuchung (BU) Arch. Lebensmittelhyg. 25, 49-53 (1974)

Mayr, A. u. Bibrack, B.: Antibiotikaallergien beim Tier. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 82, 182-187 (1969)

Mayer, H.: persönliche Mitteilung (1973)

Mc Coy, D.W. u. Faber, J.E.: Influence of food microorganisms on staphylococcal growth and enterotoxin production in meat. Appl. Microbiol. 14, 372-377 (1966)

Meyer, B., Thiel, W. u. Weiss, W.: Bedeutung und Nachweis von Hemmstoffen im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Fleischwirtschaft 49, 203-209 (1969)

Merck, E.: Mikrobiologisches Handbuch. E. Merck, Darmstadt (1974)

Meyn, A., Kalich, J. u. Merkenschlager, M.: Der Einfluß der Antibiotika-Beifütterung und der Antibiotika-Therapie auf das Ergebnis der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 73, 81-87 (1960)

Miles, A.A. u. Misra, S.S.: (Zit. nach Oberzill, W., Mikrobiologische Analytik, 1967) J. Hyg. 38, 732 (1938)

Miller, B.F., Abrams, R., Dorfman, A. u. Klein, M.: Antibacterial properties of protamine and histone. Science 96, 428, 430 (1942)

Mossel, D.A.A., u. Ingram, M.: The physiology of the microbial spoilage of foods. J. Appl. Bact. 18, 232-268 (1955)

Mossel, D.A.A.: Nahrungsmittel als Umwelt für Mikroorganismen, die Lebensmittel gesundheitsschädlich machen. Alimenta 8, 8-19 (1969)

Müller, J.: Zum Vorkommen von Proteus bei der bakteriologischen Untersuchung und seine Differenzierung. Vet. med. Diss. München (1969)

Nassal, J. u. Nieper, L.: Hemmstoffnachweis bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung im Raum Nordbaden. Tierärztl. Umschau 26, 580-582 (1971)

Negroni, P. u. Fischer, J.: Antibiotic action of protamines and histones. Rev. Soc. argent. biol. 20, 307-314 (1944)

Neter, E.: Zur Antibiotikaresistenz von Salmonellen. Fortschritte der Medizin 87, 1394-1396 (1969)

Nouws, J.F.M.: Mikrobiologisch aktive Antibiotikarückstände bei normal geschlachteten, mit Milchaustauschern gefütterten Mastkälbern. Fleischwirtschaft 54, 1066-1071 (1974)

Oberhofer, T.R. u. Frazier, W.C.: Competition of Staphylococcus aureus with other organisms. J. Milk Fd. Technol. 24, 172-175 (1961)

Oberzill, W.: Die Antibiotika, Bd. I, Teil I Verlag Hans Carl, Nürnberg (1962)

Obiger, G.: Grundsätzliche Bemerkungen des Bundesgesundheitsamtes zum allgemeinen Hemmstofftest (zugleich eine kritische Stellungnahme zu den in letzter Zeit vorgetragenen Einwänden). Tagung d. ALTS, 15. bis 17.11.1973 in Berlin

Olitsky, L.: (Zit. nach Lewis, 1929) Inaug. Diss. Bern (1891)

Parker, M.T. u. Simmons, L.E.: The inhibition of Corynebact. diphteriae and other grampositive organisms by Staphylococcus aureus. J. gen. Microbiol. 21, 457-476 (1959)

Pähr, J.: Über den bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung festgestellten Keimgehalt und seine Aussage für den Fleischbeschautierarzt. Tierärztl. Umschau 18, 172-175 (1963)

Pedersen, H.: The use of concentrated extracts from tissue in the determination of penicillin and tetracyclines in slaughtered poultry to which fodders containing antibiotics have been fed.
Yb. Roy Agrc. College, Copenhagen, 33-60, (1965)

Pesti, L.: Az egészséges sertés bélbaktérium - flórájának kvalitativ és kvantitativ vizsgálata.
Magyar Allatorvosok Lapja 17, 336 (1962)
(Zit. nach Lörincz u. Incze)
J. Appl. Bact. 27, 208-212 (1964)

Peterson, A.C., Black, J.J. u Gunderson, M.F.: Staphylococci in competition.
I. Growth of naturally occurring mixed populations in precooked frozen foods during defrost.
Appl. Microbiol. 10, 16-22 (1962 a)

Peterson, A.C., Black, J.J. u. Gunderson, M.F.: Staphylococci in competition.
II. Effect of total numbers and proportion of staphylococci in mixed cultures on growth in artificial culture medium.
Appl. Microbiol. 10, 23-30 (1962 b)

Pichnarcik, J., Wenzel, S. u. Gisske, W.: Beitrag zur Methodik des Hemmstoffnachweises in Organen und Muskulatur von Schlachttieren.
Arch. Lebensmittelhyg. 20, 272-279 (1969)

Pivovarov, Y.P. u. Kukhto, A.I.: Effect of canned food pH on growth of Bacillus cereus.
Voprosy Pitaniya 29, 72-75 (1970)

Pusztai, S. u. Ivanovits, M.: Changes in the microbial flora of frozen chopped pork-liver during storage. Hütöipar 17, 48-52 (1970)

Reuter, G.: Erfahrungen mit Nährböden für die selektive mikrobiologische Analyse von Fleischerzeugnissen. Arch. Lebensmittelhyg. 19, 53-57, u. 84-89, (1968)

Reuter, G.: Mikrobiologische Analyse von Lebensmitteln mit selektiven Medien. Arch. Lebensmittelhyg. 21, 30-35 (1970)

Reuter, G.: Antagonistische Wirkung der Milchsäurebakterien auf andere Keimgruppen der Lebensmittelflora. Zbl. Vet. Med. B 19, 232-246 (1972)

Reuter, G. u. Marx, M.: Ansatzpunkte zur Verbesserung der amtlichen bakteriologischen Fleischuntersuchung. Tagungsbericht des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Garmisch-Partenkirchen, S. 13-22, (1974)

Reuter, G. u. Marx, M.: Ein Probenentnahmegerät für die Gewinnung von Fleisch- und Organproben. Vortrag Berl. tierärztl. Gesellschaft am 16.6.1976

Ritter, P.: Der Antagonismus der Milchsäurebakterien gegen die Bakterien der Coli-Aerogenes-Gruppe. Schweiz. Milchztg. 76, Nr. 2 (1950)

Ritter, P.: Der Antagonismus der Milchsäurebakterien gegen die Bakterien der Coli-Aerogenes-Gruppe. Schweiz. Z. allgem. path. Bakt. 15, 599-603 (1952)

Ritter, P.: Der Antagonismus der Milchsäurebakterien gegen die Bakterien der Coli-Aerogenes-Gruppe. II. Die Bildung spezifisch antibiotischer Stoffe durch die Milchsäurebakterien. Schweiz. Milchztg. 82, 273-280 (1956)

Rieve, D., Wermessen, H. u. Zimmermann, Th.: Untersuchungen zur Bestimmung von Antibiotika als Ergänzung zum biologischen Hemmstofftest. Arch. Lebensmittelhyg. 25, 264-267 (1974)

Rödel, W. u. Leistner, L.: Ein einfacher a_w-Wert-Messer für die Praxis. Fleischwirtschaft 51, 1800-1802 (1971)

Roglmeier, R.: Nutzeffekt einer Arzneimittelprophylaxe bei Mastkälbern mit Chlortetracyclin-HCL bzw. Lymphovital unter optimalen Produktionsbedingungen. Tierärztl. Umschau 30, 174-184 (1975)

Rosebury, Th., Gale, D. u. Taylor, D.F.: An approach to the study on interactive phenomena among microorganisms indigenous to man. J. Bact. 67, 135-152 (1954)

Roth, L.: Vergleiche der quantitati en und qualitativen Aussagefähigkeit des allgemeinen mikrobiologischen Hemmstofftestes mit dem mikrobiologisch-chemischen Antibiotika-Nachweisverfahren bei normal geschlachteten Kälbern und Rindern.
Vet. med. Diss. Hannover (1971)

Schaal, E.: Erfahrungen über den mikrobiologischen Hemmstoffnachweis bei Geflügelfleisch.
Fleischwirtschaft 13/41, 561-563 (1961)

Schaal, M.: Untersuchungen über die Empfindlichkeit von Testkeimen im allgemeinen Hemmstofftest (A.H.Test) und mikrobiologisch-chemischen Test (M.C.Test) im Hinblick auf die quantitative und qualitative Nachweismöglichkeit von Hemmstoffen (Antibiotika) in Fleisch.
Vet. med. Diss. Hannover (1972)

Scheibner, G.: Vorkommen und Abbau von Antibiotika im Fleisch.
Mhefte Vet. Med. 24, 739-742 (1969)

Schiøtz, A.: (Zit. nach Jennings u. Sharr, 1947)
Ugeskrift f. Loeger, Copenhagen 71,
1373 (1909)

Schmidt, U.: Antibiotika-Rückstände im Fleisch und deren Veränderung bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen.
Vortrag vor der Stuttgarter Tierärztlichen Gesellschaft (Mai 1974)

Schmidt-Lorenz, W.: Methoden zur quantitativen Isolierung und Bestimmung von in Lebensmitteln vorkommenden Bakterien.
Zbl. Bakt. I. Abt. Suppl. 1, 270-306 (1965)

Schmidt, U., Woltersdorf, W., Cremling, K. u. Schraml, G.: Rückstände in Schlachttierkörpern von Schweinen und Verabreichung von Flavophospholipol und Nitrovin mit dem Futter. Fleischwirtschaft 55, 395-398 (1975)

Schönberg, F.: Über die Bedeutung der Behandlung der Schlachtschweine (Brühen, Entborsten, Oberflächenreinigung) kurz nach der Schlachtung für den Bakterienbefall des Fleisches und der Haut unter besonderer Berücksichtigung der Erzeugung möglichst keimarmer Schinken für den Export. Fleischwirtschaft 5/33, 31-32 (1953)

Schönherr, W.: Tierärztliche Milchüberwachung. S. Hirzel Verlag, Leipzig (1965)

Scott, W.J.: Water relations of food spoilage microorganisms. Adv. Food. Res. 7, 83-127 (1957)

Seidel, G. u. Kind, H.: Zur Frage des allgemeinen Keimgehaltes bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Mhefte Vet. med. 20, 108-112 (1965)

Sharpe, E.M.: Lactobacilli in meat products. Food Manufacture 37, 582-584, 587-589 (1962)

Simmons, J.S.: A culture for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolating of certain fungi. J. Infect. Dis. 39, 209 (1926) (Zit. nach Merck, 1974)

Skarnes, R.C. u. Watson, D.W.: Antimicrobial factors of normal tissues and fluids. Bact. Rev., Baltimore 21, 273-294 (1957)

Smith, H.W. u. Crabb, W.E.: The bacterial flora of the faeces of animals and man; its development in the young. J. Path. Bact. 82, 53-66 (1961)

Stavikova, M.: Über die Verwendung des Indigokarmins zum Nachweis von Streptomycin und Chloramphenicol in der Milch intramammär mit diesen Antibiotika behandelter Kühe. Vet. med. Prag 14, 625 (1969)

Steffen, C.: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1968)

Strong, D.H., Foster, E.F. u. Duncan, C.L.: Influence of water activity on the growth of Clostridium perfringens. Appl. Microbiol. 19, 980-987 (1970)

Subba, M.S., Soumithri, T.C. u. Suryanarayana-Rao, R.: Antimicrobial action of citrus oils. J. Food Sci. 32, 225 (1967)

Terplan, G., Barthel, G. u. Zaadhof, K.-J.: Zum Nachweis von Hemmstoffen im Harn. Arch. Lebensmittelhyg. 25, 261-264 (1974)

Tiews, J.: Über die Bedeutung und Auswirkung der Antibiotikafütterung in der tierischen Produktion. Mitt. Tierk. 126, 7 (1970)

Tonge, R.J., Baird-Parker, A.C. u. Cavett, J.J.: Chemical and microbiological changes during storage of vacuum packed sliced bacon. J. Appl. Bact. 27, 252-264 (1964)

Troller, J.A. u. Frazier, W.C.: Repression of Staphylococcus aureus by food bacteria. I. Effect of environmental factor on inhibiton. Appl. Microbiol. 11, 11-14 (1963 a)

Troller, J.A. u. Frazier, W.C.: II. Causes of inhibition. Appl. Microbiol. 11, 163-165 (1963 b)

Ugur, M.: Das Verhalten antibiotisch wirksamer Rückstände im Fleisch nach Hitze- und Gefrierbehandlung mit Untersuchungen über die Brauchbarkeit verschiedener Teststämme im Agardiffusionstest. Vet. med. Diss, Berlin-West (1975)

Untermann, F.: Varianzanalytische Untersuchungen über die Fehlergröße der "drop-plating"-Technik bei kulturellen Keimzahlbestimmungen an Lebensmitteln. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 215, 563-571 (1970)

Vanderzant, C.: Interactive phenomena among bacteria of dairy origin. J. Dairy Sci. 51, 991-995 (1968)

van Heyningen, W.E.: The antibacterial activity of haematin. J. gen. Microbiol. 5, 758-765 (1951)

van Schothorst, M.: Nachweis und Identifizierung einiger Antibiotika bei Schlachttieren. Fleischwirtschaft 50, 1085-1087 (1969)

Vesting, W.: Zur Frage der Infektion der Haut bzw. des Fleisches mit Laktobazillen beim Ausschlachten und Herrichten von Schweinen. Vet. med. Diss, Hannover (1961)

Vogel, H.: Antibiotika in der Haustierfütterung. Editio Cantor / Sulendorf in Württemberg (1953)

Vogel, H.: Hemmstoffe - Heilstoffe. Verlag Hans Carl, Nürnberg (1953)

von Sprockhoff, H.: Zum Nachweis von Antibiotika in der Niere von Schlachttieren bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung mittels Triphenyltetrazoliumchlorid. Arch. Lebensmittelhyg. 11, 37-38 (1960)

Watson, W. u. Bloom, W.L.: Antibacterial activity of a natural and synthetic polypeptide. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 81, 29-33 (1952)

Welch, H.: Problems of antibiotics in food as the food and drug administration sees them. Am. J. Publ. Health 47, 701-705 (1957)

Welz, W.C.: Zur Frage einer möglichen Beeinflussung des Hemmstoffnachweises im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung durch in Pflanzen vorkommende antibakterielle Wirkstoffe. Arch. Lebensmittelhyg. 10, 230-231 (1967)

Wenzel, S.: Allgemeiner Hemmstoffnachweis bei krankgeschlachteten Rindern und Schweinen und ein Vergleich mit dem Hemmstoffnachweis bei normalgeschlachteten Tieren. Arch. Lebensmittelhyg. 9, 200-205 (1971)

ders.: Hochspannungselektrophoretische Trennung der Antibiotika mit anschließendem spektralphotometrischem und mikrobiologischem Nachweisvergleich. Habil.-Schrift Hannover (1971)

Wheater, D.M., Hirsch, A. u. Mattick, A.T.R.: "Lactobacillin", an antibiotic from Lactobacilli. Nature 168, 659 (1951)

von Wikullil, L.: Wachstumsverhältnisse in Bakterienmischpopulationen. Zbl. Bakt. I. Orig. 126, 488-508 (1932)

Winter, A.G.: Untersuchungen über Antibiotika höherer Pflanzen. Dtsch. Naturwiss. 39, 230-244 (1952)

Wodzinsky, R.J. u. Frazier, W.C.: Moisture requirements of bacteria. II. Influence of temperature, pH and malate concentration on requirements of Aerobacter aerogenes. J. Bact. 81, 353-358 (1961)

Wynne, E.S.: Antagonism by Aerobacter strains. J. Bact. 53, 469-478 (1947)

Wynne, E.S. u. Norman, J.O.: On the concept of "direct antagonism" in bacteria. J. Infect. Dis. 93, 243-246 (1953)

Zähner, "Biologie der Antibiotika" Springer-Verlag Berlin (1965)

Zeiträg, K.: Zum biologischen Nachweis aus Futterpflanzen stammende Hemmstoffe in der Milch. Vet. med. Diss. Hannover (1970)

Zubrzycki, L. u. Spaulding, E.H.: (Zit. nach Hentges u. Freter, 1962) Bact. Proc. 101 (1957)

Zubrzycki, L. u. Spaulding, E.H.: (Zit. nach Hentges u. Freter, 1962) Diss. Temple Univ., Philadelphia (1958)

Zukerman, I. u. Minkewitsch, I.: Zur Frage des bakteriellen Antagonismus. Zbl. Bakt. Ref. 80, 483-484 (1925)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor
Dr. Hans-Jürgen Sinell für die Überlassung des
Themas und der jederzeit freundlich gewährten
Beratung bei der Anfertigung der Arbeit danken.

Lebenslauf

21. März 1939	in Teheran/Iran geboren als Sohn des Mohamed Alaghamandan und seiner Ehefrau Robabe
1958	Abitur
1958 - 1963	als Volksschullehrer in Teheran tätig
1964 - 1965	Studienkolleg in Hannover
Oktober 1965	Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Hochschule in Hannover
Oktober 1971	Weiterstudium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
31. Mai 1972	3. Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung Bestallung als Tierarzt
21. April 1973 bis Dezember 1975	als Fleischbeschautierarzt im Vieh-Schlachthof Berlin-Spandau tätig

Druck: Schnelldruck Steglitz, 1 Berlin 41,
Berlinickestraße 14-15, Tel.: 791 80 80